

Х.-Д. Якубке
Х. Ешкайт

АМИНОКИСЛОТЫ ПЕПТИДЫ БЕЛКИ

Перевод с немецкого
канд. хим. наук Н. П. Запеваловой
и канд. хим. наук Е. Е. Максимова
под редакцией
д-ра хим. наук, проф. Ю. В. Митина

Москва «Мир» 1985

3. Белки

3.1. Значение. Исторический аспект

Белки — высокомолекулярные соединения, полностью или большей частью построенные из аминокислот и составляющие большую часть органических веществ, содержащихся в живой клетке. Например, клетка кишечной палочки *Escherichia coli* содержит 3000 различных белков, а человеческий организм — 1000000. Молекулы белков состоят из одной или нескольких полипептидных цепей, организованных в характерную трехмерную структуру. Индивидуальные белки имеют определенный химический состав. Их молекулярные массы охватывают интервал от 6000 до более миллиона.

Обмен веществ, структура и функция каждой клетки в решающей степени определяются белками. Химические реакции в клетке, которые *in vitro* протекали бы исключительно медленно, ускоряются особыми каталитическими белками, ферментами, в сотни тысяч раз. Само собой разумеется, что при этом подвергается влиянию не состояние равновесия реакции, а скорость его наступления. Другие белки выполняют внешние или внутренние защитные функции.

Структурные и каркасные белки — важные элементы защитных и соединительных тканей; иммуноглобулины играют решающую роль в иммунной системе организма, фибриноген и тромбин действуют как факторы свертывания крови. Особые белки принимают участие в построении мембран и тем самым ответственны за отделение клетки от внешней среды и разделение внутриклеточного пространства. Белки-переносчики осуществляют, например, электронный перенос при дыхании и фотосинтезе, в других случаях они транспортируют продукты обмена веществ. Кислород в крови переносится гемоглобином, железо — трансферрином, медь — церулоплазмином и жирные кислоты — альбуминами плазмы. Резервные белки, такие, как альбумин яичного белка или казеин молока, образуют запас аминокислот для растущего эмбриона. Ферритин — «кладовая» железа в селезенке, глиадин (из пшеницы), ценин (из манса) и туберин (из картофеля) — известные растительные резервные белки. Сократительные белки актин и миозин действуют совместно в двигательном процессе мышечных клеток (мышечное сокращение). Рецепторные белки, например сАМР-рецепторный белок, способствуют специфическому связыванию активного вещества в соответствующем месте. Белки с антивирусными свойствами, интерфероны, образуются после первичной вирусной инфекции организма и подавляют дальнейшее размножение вирусов. Часть растворимых глобулярных белков служит для поддержания осмотического давления.

Ряд белков относится к гормонам (разд. 2.3.1). Токсические белки, токсины, образуются микроорганизмами, но распространены также в животном и растительном мире. Этот подбор вполне достаточен для того, чтобы иметь первое представление о центральной роли класса веществ, называемого белками.

Принцип построения белков определен генетическим материалом клетки. Информация, содержащаяся в ДНК, определяет число и последовательность аминокислот в образующейся в процессе биосинтеза полипептидной цепи. После отделения от рибосомы спонтанно образуется структура, необходимая для выполнения определенной биологической функции. Установление этой биологически активной белковой структуры необходимо для понимания процессов жизнедеятельности, протекающих на молекулярном уровне.

Наряду с жирами и углеводами белки — основная составная часть пищи человека. В индустриальных странах главным источником пищевых белков являются продукты животного происхождения, в то время как в развивающихся странах в пище преобладают биологически неполноценные растительные белки. Для удовлетворения потребности постоянно растущего населения помимо увеличения производства животных и растительных продуктов, выведения сортов зерновых с повышенным содержанием недостающих аминокислот и повышения ценности биологически неполноценных растительных белков добавлением синтетических аминокислот все большее значение приобретает дальнейшее развитие микробиологических процессов получения белков одноклеточных микроорганизмов [10 — 15]. Микробиологические процессы основаны на способности определенных микроорганизмов использовать в обмене веществ в качестве источника углерода такие вещества, как углеводороды нефти, спирты или сырье, содержащее углеводы (крахмал, меласса, целлюлоза). Обзор важнейших процессов дан в табл. 3-1.

Таблица 3-1. Микробиологическое производство белков одноклеточных [10]

Источник углерода	Источник азота	Микроорганизм	Выход, кг продукта/кг субстрата
n-Алканы Этанол Углеводы	Аммиак, соли аммония	Дрожжи	
		<i>Candida lipolytica</i>	1,0
		<i>Saccaromyces</i>	0,66
Целлюлоза	Аммиак, соли аммония	<i>Torula</i>	0,5
		Бактерии	
		<i>Tricoderma viridis</i>	0,5
Углекислый газ	Нитраты, мочевины	<i>Methylococcus</i>	1,0
		<i>Methylomonas</i>	0,5
		Водоросли	
		<i>Chlorella</i>	0,01 ^a

^a Выход рассчитан как соотношение энергии света к энергии, содержащейся в биомассе.

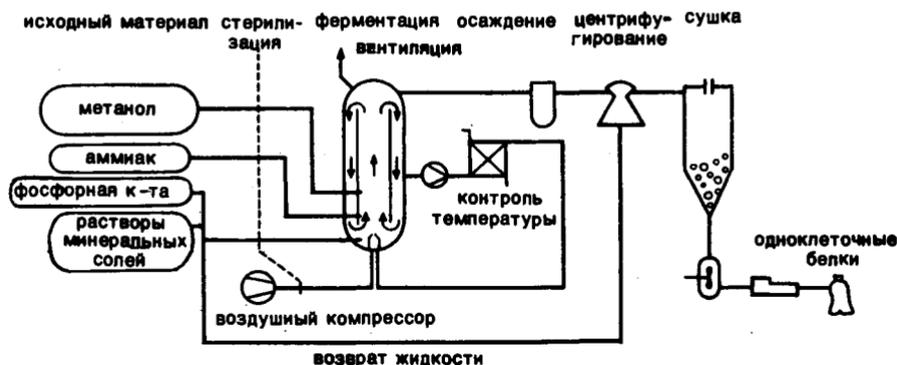


Рис. 3-1. Микробиологический процесс синтеза белка на основе метанола.

Преимущества микробиологического процесса заключается в быстром получении биомассы с высоким содержанием белков хорошего качества и в независимости процесса производства от климата и времени года. Лишь белки водорослей более целесообразно производить в местах с постоянной и интенсивной солнечной радиацией.

В настоящее время промышленные установки на основе метанола и нефти с производительностью до 100 000 т биомассы в год работают в СССР, Италии, Англии и Японии [16]. В ГДР сооружена установка с производительностью 55 000 т/год (производство фермозина), использующая в качестве сырья фракции дизельного топлива.

На рис. 3-1 приведена схема микробиологического процесса на основе метанола.

Белки микробного происхождения в настоящее время применяются вместо сои и рыбной муки прежде всего как корм в животноводстве (при выкармливании птицы, свиней, для подкормки рыбы), причем текстура, окраска и вкус таких кормов могут меняться в соответствии с привычками животных. Для непосредственного питания человека белки микробного происхождения пока еще не применяются. Состав биомасс, полученных в различных процессах, приведен в табл. 3-2.

Применяемая до сих пор лишь в незначительном объеме целлюлоза в будущем станет основным сырьем для микробиологического синтеза белка. Подходящие для этого бактериальные штаммы изучаются. Оптимизацией условий ферментации (марганец в качестве микроэлемента) была достигнута степень превращения до 60%. Из 1 кг соломы получают, например, 250 — 300 г биомассы.

Прямое использование зеленой массы растений, особенно белков, содержащихся в зеленых листьях, является дальнейшей возможностью для устранения нехватки белков. В листьях белки составляют ~30% сухой массы и могут быть экстрагированы с 50 — 60%-ным выходом. Животные, поедая листья, используют белки лишь на ~18%. По биологической ценности белки листьев сравнимы с белками соевых бобов.

Еще в 1784 г. было высказано мнение, что белки образуют самостоятельный класс веществ. Дальнейшее уточнение понятия приписывают Малдеру, предложившему называть белки (1839 г.) *протеинами* (от греческого

Таблица 3-2. Состав биомассы различных микробиологических продуцентов белка [10]

Компоненты биомассы	Состав биомассы, %						
	Дрожжи (алкано-вые)	Метанольные бактерии		Грибы	Водоросли	Соевая мука	Сухое молоко
		фирма ICI	фирма Hoechst				
Суммарный белок	60	89	91	31,7	72,6	45	34
Жиры	9	9,5	0,5	4,9	7,3	1,8	1
Нуклеиновые кислоты	5	15	1				
Минеральные вещества	6	9,5	3,5	2	4,7	6	8
Аминокислоты	54	65	102			40	
Вода	4,5	2,8	4,0	13,5	3,6	12	5

protos — первый, первичный). (Сам термин «протеины» был введен еще Берцелиусом.) После первых попыток Кюна установить строение белков ферментативными методами Косселю на рубеже XX века удалось выделить целый ряд белковых веществ. Примерно в то же время Хофмайстер и Фишер установили принцип химического построения белков, затем подтвержденный последним с помощью целенаправленного химического синтеза [17 — 19].

Первым белком, полученным в кристаллическом состоянии, стал яичный альбумин. В 1925 г. Абель осуществил кристаллизацию инсулина, а 10 годами позднее Зумнер описал кристаллизацию уреазы. Вирус табачной мозаики получен в кристаллическом состоянии в 1935 г.

В период между 1925 — 1930 гг. Сведберг с помощью ультрацентрифугирования произвел определение молекулярных масс различных белков. Одновременно применение других аналитических методов, как, например, электрофореза и различных видов хроматографии, привело к развитию аналитической белковой химии. В 1951 — 1956 гг. Сенгер [20, 21] установил аминокислотную последовательность инсулина. Искользованные при этом методы легли в основу систематического определения первичной структуры многих белков. Созданный Эдманом в 1966 г. секвенатор и применение масс-спектрометрии в сочетании с ЭВМ как средством регистрации, обработки и оценки масс-спектрометрических данных привели к тому, что к настоящему времени опубликовано более 15 000 работ, посвященных определению аминокислотных последовательностей, и установлены первичные структуры более чем для 1000 белков.

После 1945 г. началось систематическое исследование пространственной структуры белков. Основываясь на работах по белковым конформациям

Полинга и Кори, Кендрю и Перутц с помощью рентгеноструктурного анализа монокристаллов установили пространственные структуры миоглобина и гемоглобина, продемонстрировав этим возможность, основываясь на полученных *in vitro* структурных данных, делать выводы о механизме биологической активности белков *in vivo*. На примере первой установленной пространственной структуры фермента лизоцима описаны на молекулярном уровне процессы связывания и расщепления субстрата.

В 1969 г. Меррифилд сделал попытку осуществить химический синтез фермента рибонуклеазы.

3.2. *Классификация белков*

Из множества белков, существующих в живых организмах, первичные структуры в настоящее время известны лишь для некоторых. Пока не представляется возможным систематически классифицировать белки по структурно-функциональным параметрам. Используются различные принципы классификации, часто перекрещивающиеся и во многих отношениях несовершенные.

Взяв за основу происхождение организма, различают растительные, животные, вирусные и бактериальные белки, в то же время учитывая органы и клеточные органеллы — белки плазмы, мышечные белки, белки молока, яиц, рибосомные белки, белки клеточного ядра, микросом и мембран.

По общим биологическим функциям можно подразделить белки на ферменты, структурные, транспортные, резервные и рецепторные белки.

На различии в растворимости и строении молекулы основано подразделение белков на глобулярные и фибриллярные.

Глобулярные белки растворимы в воде и разбавленных солевых растворах и обладают шарообразной формой молекулы (эллипсоид вращения). Компактная структура возникает при определенном сворачивании полипептидной цепи; в основе такой структуры, по существу, лежит гидрофобное взаимодействие неполярных боковых цепей аминокислот. Помимо этого во взаимодействии отдельных участков цепи играют роль водородные связи и в некоторой степени ионные связи. Хорошая растворимость глобулярных белков объясняется локализацией на поверхности глобулы заряженных аминокислотных остатков, которые, окружая себя гидратной оболочкой, обеспечивают хороший контакт с растворителем. К глобулярным белкам относятся все ферменты и, за исключением структурных, большинство других биологически активных белков.

Со времени зарождения белковой химии принято деление глобулярных белков на альбумины, глобулины, гистоны, проламины, протамины, глутелины. Оно основано на более или менее выраженных различиях в растворимости, распределении зарядов и аминокислотном составе отдельных белков.

Альбумины хорошо кристаллизуются, растворимы в воде в интервале pH 4 — 8,5, осаждаются 70 — 100%-ным (от насыщения) раствором сульфа-

та аммония. Широко распространенные полифункциональные *глобулины* более высокомолекулярны, чем альбумины, труднее растворимы в воде с типичным минимумом растворимости в изоэлектрической точке, растворимы в солевых растворах и чаще всего содержат углеводную часть.

Гистоны — низкомолекулярные основные, из-за высокого содержания лизина и аргинина, белки. Растворимы в воде и кислотах, как, впрочем, и сильноосновные *протамины*, содержащие до 85% аргинина. Гистоны и протамины образуют устойчивые ассоциаты с нуклеиновыми кислотами и выступают в качестве регуляторных и репрессорных белков (нуклеопротеины).

Признаком *проламинов* является высокое содержание глутаминовой кислоты (30 — 45%) и пролина (15%). Они нерастворимы в воде, но растворяются в 50 — 90%-ном этаноле. Вместе с содержащими глутаминовую кислоту (до 45%) *глутелинами* они чаще всего встречаются в белках зерна.

Фибриллярные белки практически нерастворимы в воде и солевых растворах, обладают волокнистой структурой. Полипептидные цепи, расположенные параллельно одна другой в форме длинных волокон, образуют структурные элементы соединительных тканей. Важнейшие представители этой группы структурных белков — коллагены, кератины и эластины (разд. 3.8.3).

От обычных белков, состоящих исключительно из протеиногенных аминокислот, следует отличать сложные белки, называемые также *конъюгированными белками* или *протеидами*. Это вещества, содержащие помимо белковой части небелковый органический или неорганический компонент, необходимый для функционирования, могущий быть связанным с полипептидной цепью ковалентно, гетерополярно или координационно и вместе с аминокислотами присутствующий в гидролизате. Важнейшие представители сложных белков: гликопротеины (простетическая группа — нейтральные сахара (галактоза, манноза, фукоза), аминоксахара (N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин) или кислые производные моносахаридов (уроновые или сиаловые кислоты)); липопротеины, содержащие триглицериды, фосфолипиды и холестерин, металлопротеины с ионом металла, связанного координативной связью, фосфопротеины, связанные эфирной связью через остаток серина или треонина с фосфорной кислотой, нуклеопротеины, ассоциирующиеся с нуклеиновыми кислотами в рибосомах или вирусах, а также хромопротеины, содержащие в качестве простетической группы окрашенный компонент. Обзор структур важнейших белков см. в разд. 3.8.

3.3. Выделение и очистка [22—25]

Выделение нерастворимых фибриллярных белков не сопряжено с особыми трудностями, в то же время очистка индивидуальных глобулярных белков из животных или растительных тканей, бактериальных культур и клеточных суспензий сильно затруднена одновременным присутствием в растворе многих других белков, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов и других

биомолекул. К этому добавляется чувствительность белка к протеолитическим ферментам, влияние температуры и других факторов, вызывающих денатурацию. Лишь в исключительных случаях, например при выделении гемоглобина из эритроцитов, казеина из молока или альбумина из яичного белка, белковая часть превосходит в количественном отношении остальные компоненты настолько, что уже обычное осаждение приводит к относительно чистому продукту. В других случаях требуются сложные многостадийные операции очистки, которые на каждой стадии необходимо контролировать с помощью аналитических или биологических тестов.

На первой стадии разрушают биологический материал. Обычно начинают с разрезания и затем механического размельчения в гомогенизаторе. Для разрыва клеточных стенок используются различные методы: обработка ультразвуком, встряхивание со стеклянными шариками, растирание замороженного материала в ступке, осмотический шок, осмотический лизис дистиллированной водой, обработка поверхностно-активными веществами или воздействие протеазами. Нежелательные составные части клеток могут быть отделены центрифугированием, нуклеиновые кислоты отделяют осаждением протаминсульфатом, углеводы — электрофорезом, липиды — низкотемпературной экстракцией органическими растворителями.

При выделении желаемого белка обычно сначала экстракцией водой или разбавленным соевым раствором получают обогащенную белковую фракцию. Собственно, процесс разделения может основываться на различной (в определенных условиях) растворимости, различном размере, различном электрическом заряде или различных адсорбционных свойствах молекул белков, а также на различной биологической активности. К выделению индивидуального белка может привести также взаимодействие с комплексообразующими веществами, например альбуминами, альгинатами, пектинами [26].

Разработанные к настоящему времени методы разделения исключительно эффективны, однако лишь их комбинированное применение приводит к получению белков, удовлетворяющих необходимым критериям чистоты.

Разделение на основе различной растворимости относится к наиболее старым методам выделения и очистки белков. При *изоэлектрическом осаждении* разделение достигается благодаря минимальной растворимости глобулярного белка в изоэлектрической точке (ИЭТ). Следует обратить внимание, что ИЭТ белков помимо прочего зависит от ионной силы раствора. ИЭТ некоторых белков приведены в табл. 3-6.

Для разделения белков на фракции можно использовать *метод высаливания* NaCl, KCl, NH₄Cl и особенно (NH₄)₂SO₄; последний предпочтителен, так как создает высокую ионную силу раствора и очень хорошо растворим в воде (при 0°C 709,6 г/л). Растворимость отдельных белков помимо прочего зависит от их заряда. Механизм высаливающего действия солей при осаждении белка рассмотрен в разд. 3.5.2.

Разделение белковой смеси возможно при добавлении смешивающихся с водой органических растворителей, таких, как этанол или ацетон (*фракционирование растворителем*), что ведет к снижению диэлектрической проницаемости системы. В результате снижаются гидратация и растворимость белка и при достаточно высокой

Таблица 3-3. Важнейшие методы разделения белков

Метод	Свойство, положенное в основу метода
Осаждение (изоэлектрическое осаждение, осаждение растворителем, осаждение солями)	Различная растворимость
Противоточное распределение	То же
Распределительная хроматография	" "
Диализ и ультрафильтрация	Различный размер молекул
Центрифугирование	Размер и форма молекул; плотность белковой массы
Гель-хроматография (гель-фильтрация, гелепроникающая хроматография)	Размер и форма молекул
Электрофорез (электрофорез без носителя, электрофорез на носителе: гель-электрофорез, диск-электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, изотахоэлектрофорез, иммуноэлектрофорез ^a)	Различный заряд частиц
Ионообменная хроматография	То же
Аффинная хроматография	Биоселективное взаимодействие белок—лиганд

^a Наряду с зарядом используется различная биоспецифичность.

концентрации органического растворителя происходит осаждение белковой фракции. При низких температурах (0 — 10° С) фракционирование растворителем, как и осаждение высаливанием, протекает без денатурации. Применение органических растворителей для осаждения белков имеет преимущество, так как после осаждения белков нет необходимости избавляться от солей. Фракционирование растворителем было разработано [27, 28] специально для разделения белков плазмы, но позднее применено в процессах разделения других белков. На рис. 3-2 приведена схема разделения белков плазмы с использованием изменения рН и концентрации органического растворителя (фракционирование по концентрации).

Другим методом очистки белков, основанным на различии в растворимости, является *противоточное распределение* по Крейгу [29, 30]. Сегодня оно осуществляется с помощью полностью автоматических установок, позволяющих проводить распределение разделяемых компонентов при многих тысячах ступеней переноса. Состояние равновесия при каждом распределении между двумя фазами описывается законом распределения Нернста. При разделении двух веществ эффект разделения будет тем выше, чем больше фактор переноса β , равный соотношению коэффициентов распределения K_1 и K_2 .

Противоточное распределение зарекомендовало себя при очистке пептидных веществ и промежуточных продуктов синтеза пептидов. Наиболее часто применяют следующие системы растворителей: бутанол — уксусная кислота, трихлоруксусная кислота — толуолсульфокислота, хлороформ — бензол — метанол — фенол — вода и многие другие комбинации. Сложнее подобрать систему для разделения белков из-

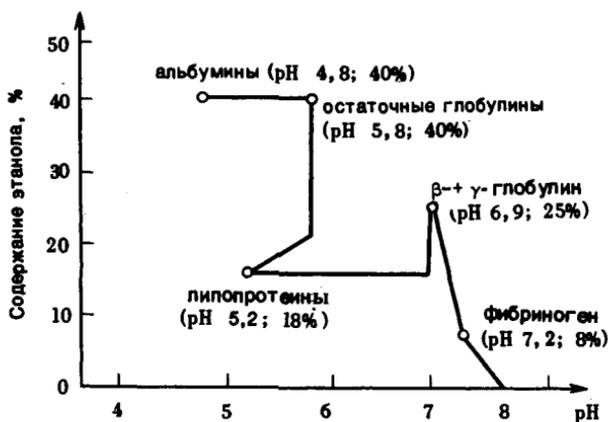


Рис. 3-2. Фракции плазмы [27, 28].

за их малой растворимости в органических растворителях и опасности денатурирования. Крейг и Хаусман [31] провели разделение рибонуклеазы и лизоцима в системе этанол — вода — сульфат аммония (3746 и 3420 соответственно ступеней переноса) при полном сохранении биологической активности. В той же лаборатории гомогенный (по данным ультрацентрифугирования) сывороточный альбумин (M 68 000) в системе бутанол — трихлоруксусная — уксусная кислота — этанол в присутствии стабилизатора при 401 ступени распределения был разделен на 4 фракции (рис. 3-3). Чистый альбумин характеризуется коэффициентом распределения $K = 0,857$. Для

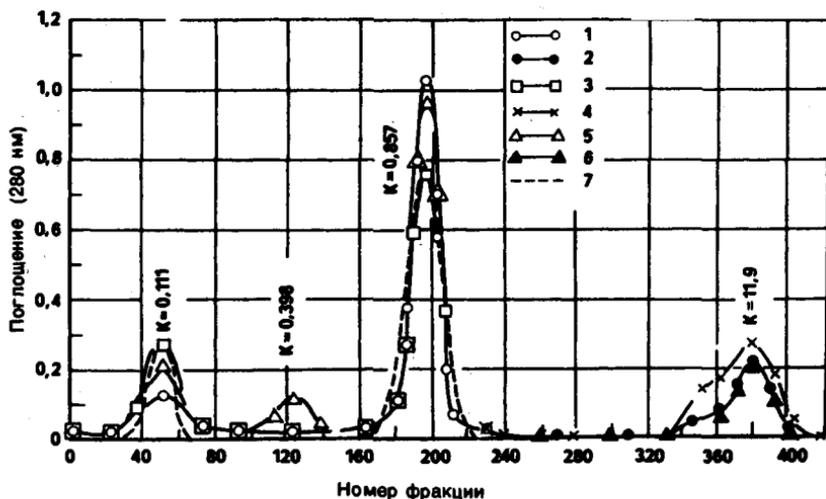


Рис. 3-3. Фракции сывороточного белка [31].

противоточного распределения высокомолекулярных белков предложено использовать растворы, содержащие полимеры, такие, как полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль с декстраном, и образующие с водой двухфазную систему. Однако в этом случае время расслоения очень велико и, кроме того, отделение белка от полимеров, содержащихся в растворе, сопряжено с существенными трудностями.

Важнейшие методы разделения белков, основанные на различии молекул по размеру, — это диализ, ультрафильтрация, центрифугирование и гель-хроматография. С помощью *диализа* и *ультрафильтрации* [32] отделяют преимущественно низкомолекулярные компоненты от белков. При проведении диализа полупроницаемая мембрана (размер пор 5 — 100 нм) беспрепятственно пропускает воду, небольшие ионы и молекулы, в то время как крупные молекулы белков задерживаются. Движущей силой процесса разделения является перепад концентраций между раствором и растворителем на мембране. При ультрафильтрации процесс разделения ускоряется путем приложения повышенного давления (0,5 — 10 бар). В качестве мембран чаще всего применяются синтетические материалы на основе производных целлюлозы и полиамиды, делающие возможным при различных размерах пор (1 — 10 нм) разделение пептидов, пептидных производных и белков.

При *ультрацентрифугировании* для разделения используется седиментация, зависящая от размера, плотности и формы молекулы белка. *Центрифугирование в градиенте плотности* (зональное центрифугирование) часто применяется для разделения белков, а также для разделения органелл и вирусов. Одной из характеристик белка служат данные седиментационного анализа в ультрацентрифуге (разд. 3.5.4). Положение возникающих белковых зон можно наблюдать с помощью оптических методов.

Гель-хроматографией [33 — 37] (при работе в водной фазе — *гель-фильтрацией*) называется молекулярно-ситовой процесс, близкий к хроматографическим методам разделения, при котором неподвижной (стационарной) фазой является, как правило, трехмерная структура полисахаридного или акриламидного геля. В зависимости от степени сшивки и размера пор геля, находящегося в набухшем состоянии, молекулы белка движутся через колонку с разной скоростью. При использовании геля с определенной степенью сшивки и размером пор скорость движения зависит от размера и формы молекул. Более крупные молекулы движутся в основном в пространстве между частичками геля и выходят из колонки первыми, мелкие молекулы проникают в поры геля и вследствие этого движутся значительно медленнее. Варьируя размеры пор, можно фракционировать белки с молекулярными массами от нескольких сотен до многих миллионов. В развитии гель-хроматографии, считающейся сегодня важнейшим и эффективнейшим методом разделения белков, особенно большую роль сыграла шведская фирма АВ-Farmacia. С 1959 г. она поставляет на рынок декстрановый гель сефадекс, получаемый из сшитого эпихлоргидрином декстрана с M 30 000 — 50 000. Декстран, высокомолекулярный гликокан с преимущественно α -1,6-гликозидными связями, получают из сахарозы микробиологическим способом.



Рис. 3-4. Изучение седиментации методом ультрацентрифугирования (ширрен-оптика).

Таблица 3-4. Гели для гель-хроматографии

Тип геля	Торговое название	Рабочий диапазон мол. масс	Фирма
Декстрано- вый гель	Сефадекс (от G-10 до G-200)	700—600 000	Pharmacia
	LH-20/LH-60	4 000/10 000	"
	Молселект (от G-10 до G-200)	700—600 000	Reanal
Агарозный гель	Сефароза (от 6В до 2В)	4 000 000—40 000 000	Pharmacia
	Биогель (от А-0,5 до А-150)	500 000—150 000 000	Bio-Rad
Полиакрил- амидный гель	Биогель (от Р-2 до Р-300)	2 500—400 000	"
	Акрилекс (от Р-2 до Р-300)	2000—300 000	Reanal
	Ультрагель (от АсА 54 до АсА 22)	70 000—600 000	LKB
Полиакрил- амидагарозный гель			
Полиакрило- илморфолино- вый гель	Энзакрил (от К0 до К10)	1000—2 000 000	Koch-Light

В дополнение к полисахаридным гелям фирмой Bio-Rad (США) предлагаются биоге-ли на полиакриламидной основе (табл. 3-4). Введение в практику макропористых полистирольных смол, ненабухающих пористых стеклянных шариков и иммобилиза-ция гидрофобных радикалов на декстрановой матрице сделали возможным гель-хроматографическое фракционирование в среде органических растворителей. Алки-лированные декстраны (типа сефадекс-LH) находят широкое применение в синтети-ческой пептидной химии [38].

Другими важными методами разделения и очистки белков являются *электрофо-рез* и *ионообменная хроматография*. Оба метода основаны на различных свойствах частиц, несущих неодинаковый заряд. Величина и знак заряда для каждого белка ха-рактеризуются числом ионизируемых боковых групп аминокислотных остатков и, как в случае аминокислот (разд. 1.4.2), могут быть установлены из кривой титрова-ния. Выше ИЭТ находится зона рН с отрицательным, а ниже ИЭТ — зона рН с из-быточным положительным зарядом молекулы.

При *электрофорезе* заряженные частички под влиянием электрического поля дви-жутся с различной, зависящей от отношения заряда к массе скоростью к аноду или катоду и таким образом могут быть отделены друг от друга. Различают электрофо-рез без носителя, при котором белковые молекулы движутся непосредственно в по-токе буфера, и электрофорез с носителем (зонный электрофорез), при котором в ка-честве носителя используют различные материалы.

Классический электрофорез без носителя осуществляют в U-образной ячейке, в которой на буферный раствор, содержащий белок, наслаивается чистый буферный раствор. Выбором подходящего рН достигают одинакового знака заряда белков, ко-

торые затем в виде, например, анионов движутся к положительному электроду и проникают в зону буферного раствора. Здесь они могут быть локализованы оптическими методами (по различию в показателях преломления) в виде так называемых «извилистых узоров».

Высокое разрешение и высокая производительность достигаются в современном электрофорезе без носителя, в котором электрическое поле приложено к текущему между двумя охлаждаемыми пластинами буферному раствору. Под действием поля белки отклоняются от направления потока буфера на определенный угол.

При наиболее продуктивном в аналитической химии белка *электрофорезе с носителем* в качестве носителя для потока буферного раствора используют целлюлозы, гели и пленки. Работают с напряженностью поля 6 — 10 В/см (низковольтный электрофорез) и при охлаждении с напряженностью до 100 В/см (высоковольтный электрофорез).

Гель-электрофорез проводится в агарозном или полиакриламидном геле. Это исключительно гибкий метод разделения; варьируя структуру геля и состав буферного раствора, можно проводить разделение на основе различия в молекулярных массах, изоэлектрических точках и биоспецифическом средстве. Особенно высокого разрешения достигают при гель-электрофорезе в полиакриламиде [39], так как здесь дополняют друг друга электрофорез и молекулярно-ситовой эффект. Сыворотка, например, расщепляется на 20 полос, в то время как при электрофорезе в агарозе появляется лишь 5 полос.

Еще лучшее разделение дает *диск-электрофорез* [40, 41], при котором используют дискретную (прерывающуюся) разделительную систему из различных буферных растворов и работают с акриламидными гелями, имеющими различные размеры пор. Несколько (минимум два) слоев геля с различными рН наслаивают один на другой, благодаря чему процессу разделения предшествует концентрирование компонентов и в результате получаются очень узкие полосы белков.

Изоэлектрическое фокусирование [42 — 45] в линейном градиенте рН позволяет разделить белки, характеризующиеся различными изоэлектрическими точками. Для создания градиента используют носители с цвиттер-ионными свойствами — алифатические полиамнополикарбоновые кислоты, имеющие M 200 — 700. При движении в градиенте рН суммарный заряд белка постоянно меняется, и в области рН, близких к изоэлектрической точке, становится равным нулю. Соответствующий белок «фокусируется», образуя узкую зону. При препаративном «фокусировании» в колонке стабилизация градиента рН осуществляется с помощью градиента плотности используемого буферного раствора, однако чаще работают с плоскими слоями полиакриламидного или гранулированного геля. Опубликовано краткое сообщение о непрерывном электрофокусировании без носителя [46]. Эффективность электрофокусирования высока. Так, возможно, например, разделить белки, различающиеся по ИЭТ лишь на 0,01 единицы рН. При разделении сыворотки образуется более 40 белковых полос.

При *изотахофорезе* (iso — равный, tacho — скорость) [47, 48], также обладающем высокой разрешающей способностью, разделяемую белковую смесь вводят в специальный электролит, содержащий ионы с более высокой подвижностью (лидирующие) и ионы с меньшей подвижностью (терминирующие), чем подвижность ионов белка при равных скоростях перемещения. При добавлении специфических промежуточных ионов, «поддерживающих интервал», разделяются белки с очень близкими подвижностями. Препаративное разделение белков проводят большей частью в колонках с полиакриламидным гелем при применении амфолитов в качестве буферных и «поддерживающих интервал» веществ, причем разделенные компоненты элюируются из колонки с помощью подходящей системы.

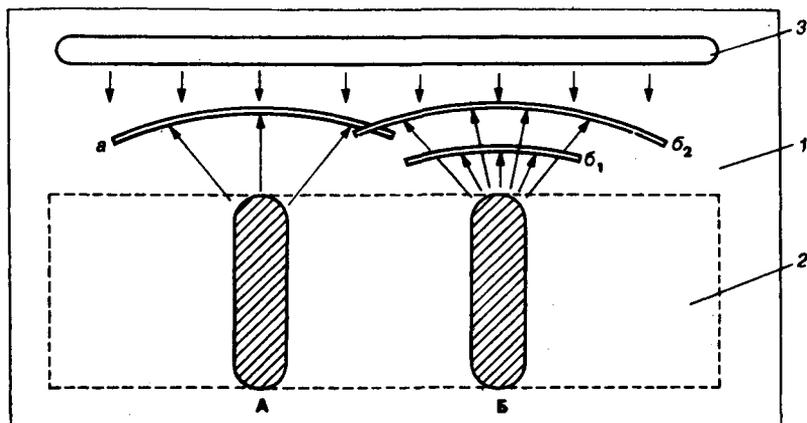


Рис. 3-5. Принцип иммуноэлектрофореза (по Рапопорту).

1 — слой агара; 2 — электрофоретически разделяемая сыворотка (смесь антигенов); 3 — антисыворотка (смесь антител). А — серологически однородная электрофоретическая фракция (а — полоса преципитации к А); Б — электрофоретическая фракция, серологически состоящая из двух компонентов (σ_1 и σ_2 — полосы преципитации к Б).

В случае *иммуноэлектрофореза* [49 — 51] принцип электрофореза сочетается с биоспецифической аффинностью белка (рис. 3-5). Белки-антигены сначала разделяются гель-электрофоретически. При встрече с диффундировавшими внутрь геля антителами происходит образование комплексов антиген — антитело, наблюдаемых в виде серповидных полос преципитации. Иммуноэлектрофорез имеет особое значение в медицинской диагностике (разделение и идентификация сывороточных белков и др.). Рис. 3-6 поясняет эффективность этого метода по сравнению с другими видами электрофореза.

При разделении белков *ионообменной хроматографией* [52] применяют прежде всего ионообменные смолы на полисахаридной основе, например аниониты DEAE-целлюлозу (двэтиламиноэтилцеллюлозу) или DEAE-сефадекс и катиониты КМ-целлюлозу (карбоксаметилцеллюлозу) или КМ-сефадекс, в которых функциональные ионообменные группы связаны с гидроксильными группами моносахаридных остатков. Гидрофильная основа ионообменников не приводит к денатурации белков. Белки, в кислой среде в виде катионов и в щелочной среде в виде анионов, связываются с соответствующим ионообменником, а затем элюируются буферным раствором с возрастающей ионной силой (концентрационный градиент) или с изменяющимся рН (градиент рН). При концентрационном градиенте ионизованные белки разделяются в результате взаимодействия с ионами соли, в случае градиента рН разделение вызвано изменением электрических зарядов белков. Ионообменная хроматография предложена в 1956 г. Петерсоном и Собером. На рис. 3-7 приведена диаграмма элюирования смеси различных гемоглобинов.

На биоселективном взаимодействии с лигандами, фиксированными на носителе, основано *разделение белков с помощью аффинной хроматографии* [54 — 61]. Ли-

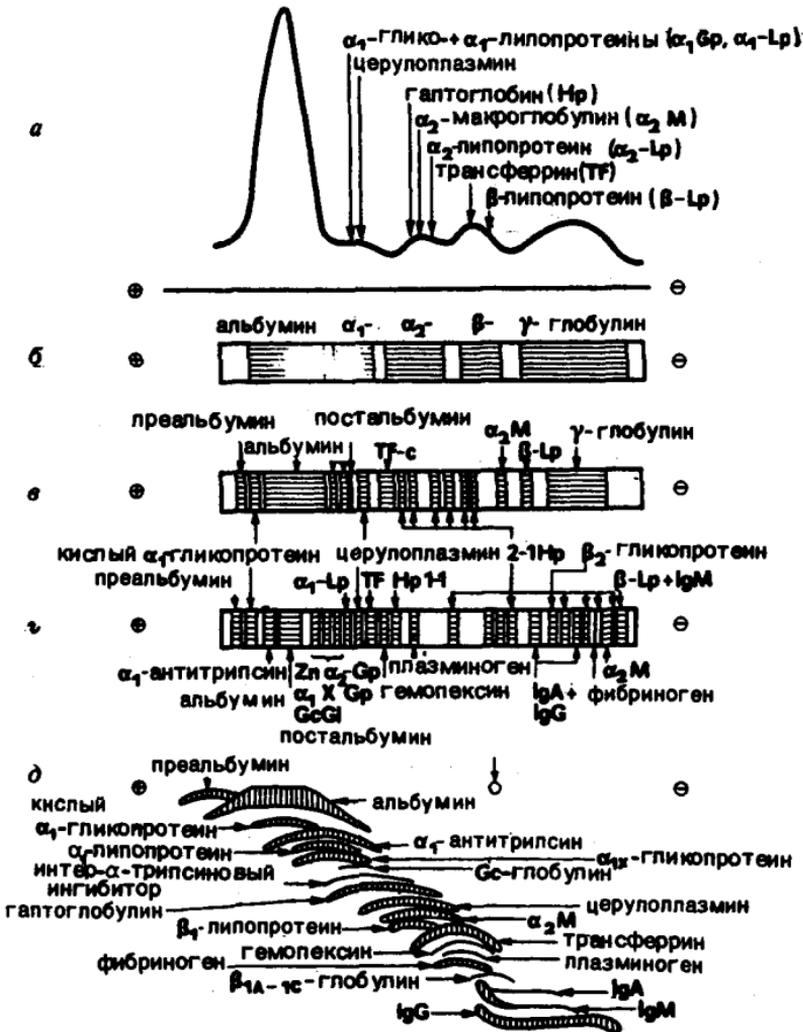


Рис. 3-б. Электрофоретическое разделение белков плазмы человека пятью различными методами при pH 8. а — электрофорез без носителя; б — электрофорез на бумаге; в — электрофорез в крахмальном геле; г — электрофорез в полиакриламидном геле; д — иммуноэлектрофорез (полосы преципитации к поливалентной антисыворотке человека). Стрелки показывают положение отдельных белков плазмы.

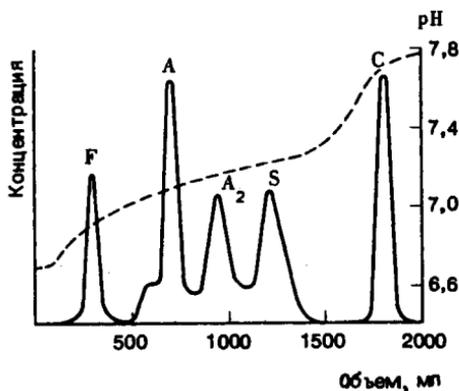


Рис. 3-7. Диаграмма элюирования при разделении различных гемоглобинов (F, A, A₂, S и C) на КМ-сефадексе С-50.

ганд, обычно низкомолекулярный (конкурентный ингибитор, кофермент, модифицированный субстрат, специфический антиген), ковалентно (сложноэфирная или амидная связь) связывается с инертным нерастворимым носителем путем азосочетания, с помощью бромциана или бифункциональных реагентов. При реакции с комплементарным белком образуется устойчивый комплекс белок — лиганд, из которого белок может быть освобожден селективно изменением рН или ионной силы. Взаимодействие белка с лигандом облегчается встраиванием между лигандом и матрицей гбковой «ножки». В качестве матрицы применяются агароза, пористое стекло, целлюлоза, сшитые декстраны и др.*

Пористое стекло (диаметр пор 5 — 250 нм), как и наиболее широко применяемые носители на основе агарозы, отличается низкой неспецифической сорбцией и высокой емкостью. Аффинная хроматография нашла широкое применение при разделении ферментов, полипептидных и белковых гормонов, антител, антигенов, а также транспортных и рецепторных белков.

Белки, полученные с помощью различных методов разделения и очистки, считаются чистыми, если их гомогенность доказывается появлением только одной белковой полосы, например, при диск-электрофорезе или характерной диффузионной константой или константой седиментации при ультрацентрифугировании.

Другой тест на чистоту вытекает из диаграммы растворимости; в случае гомогенного белка вплоть до достижения точки насыщения количество добавленного и количество растворившегося белка связаны линейной зависимостью. Критериями чистоты также служат аминокислотный состав, изоэлектрическая точка, а также в некоторой степени кристаллизуемость. В случае биологически активных белков, например ферментов, вывод о чистоте может быть сделан из критериев активности (субстратная специфичность, оптимальные рН и температура, кинетические эксперименты).

*В последнее время широкое применение в качестве матрицы для аффинных сорбентов находит жесткий макропористый гидрофильный сополимер 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата (сферон) [Туркова Я. Аффинная хроматография. — М.: Мир, 1980]. — Прим. перев.

3.4. Обнаружение и количественное определение

Для *качественного определения* белков известны различные, не всегда специфичные, классические цветные реакции, основанные часто на присутствии определенных аминокислотных остатков (табл. 3-5). С этой целью можно использовать также денатурацию при осаждении белков путем добавления трихлоруксусной, пикриновой, хлорной или фосфорновольфрамовой кислот, солей тяжелых металлов (Cu, Pb, Zn, Fe и др.) и путем нагревания в изоэлектрической точке.

Для *количественного определения* может быть использована биуретовая реакция, хотя в случае пептидов также наблюдается положительный результат. Реакция основана на образовании фиолетового медного комплекса, интенсивность окраски которого (540 — 560 нм) может быть измерена колориметрически. Гораздо более высокую чувствительность имеет метод Лаури [62], в котором при участии остатков Trp, Tug и Cys образуется комплекс белка с фосфомолибденовой кислотой и медью. Это наиболее часто применяемый колориметрический метод определения малых количеств белка. Образующийся голубой комплекс (максимум абсорбции при 750 нм) достаточно устойчив для количественного определения. В качестве стандартного белка служит сывороточный альбумин. Предел обнаруживаемости 5 — 10 мкг/мл раствора. Определению по методу Лаури мешают трис-

Таблица 3-5. Цветные реакции, применяемые для качественного определения белков

Реакция	Условия проведения	Реагирующий участок белка	Окраска
Биуретовая	Смешивают сильнощелочной раствор пробы с раствором сульфата меди(II)	Пептидная связь	Пурпурно-фиолетовая
Миллона	Нагревают раствор пробы с $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и конц. H_2SO_4	Tug	Красно-коричневый осадок
Паули	Смешивают щелочной раствор пробы с диазобензолсульфокислотой	Tug, His	Красная
Хопкинс-Коле	Смешивают пробу с глиоксиловой кислотой и под слой вводят конц. H_2SO_4	Trp	Фиолетовое кольцо
Сакагучи	Смешивают пробу с растворами α -нафтола и гипобромита	Arg	Красная
Фолина	Смешивают пробу с 1,2-нафтахинон-4-сульфоновой кислотой	Tug, Trp	
Ксантопротеиновая	Смешивают пробу с конц. HNO_3	Tug, Phe	Желтая (после добавления щелочи оранжевая)

буферы, гуанидин- и тиолсодержащие соединения. Эти факторы не оказывают влияния на результаты при *определении белка по Бредфорду* [63]. Метод основан на изменении окраски специфического красителя в зависимости от концентрации белка. При классическом количественном *определении по Кьельдалю* аналитическая проба разрушается при кипячении с концентрированной серной кислоте в присутствии катализатора, причем органически связанный азот образует эквивалентное количество сульфата аммония. Выделяющийся при добавлении щелочи аммиак поглощается раствором борной кислоты и определяется титрованием 0,01 н. H_2SO_4 .

Возможно прямое определение белка путем измерения *оптической плотности* (поглощения) при 280 нм, основанное на присутствии в белке остатков тирозина и триптофана. Зная удельный коэффициент экстинкции ϵ (оптическая плотность 1%-ного раствора белка при 280 нм и длине оптического пути 1 см), можно, исходя из измеренной экстинкции раствора белка неизвестной концентрации, установить содержание белка (в мг/1 мл).

С помощью других физико-химических методов (рефрактометрия, измерение плотности, измерение светорассеяния с помощью нефелометра) можно также определить содержание белка с большей или меньшей точностью и специфичностью.

3.5. Физико-химические свойства [5, 64, 65]

3.5.1. Цвиттер-ионная природа белковой молекулы

Амфолитная природа белка базируется на количестве кислых и основных групп в боковых цепях и их распределении, так как в общем случае концевые амино- и карбоксильные группы вносят очень малый вклад в суммарный заряд молекулы.

В зависимости от pH раствора молекулы белка несут положительный (в кислой области) или отрицательный (в щелочной области) избыточный заряд, причем в обоих случаях гидратация и растворимость возрастают. Независимо от знака заряда решающий фактор, определяющий гидратацию, — разность между суммами положительных и отрицательных зарядов на молекуле белка.

В изоэлектрической точке белковая молекула представляет собой цвиттер-ион, т. е. положительные и отрицательные заряды в молекуле взаимно уравновешиваются и суммарный заряд молекулы равен нулю; растворимость и гидратация минимальны, отсутствует движение в электрическом поле. Изоэлектрическая точка может быть определена из кривой титрования, отражающей суммарное состояние ионизации молекулы. В случае глобулярных белков ионизируемые группы преимущественно локализованы на поверхности молекулы. Группы, находящиеся внутри или принимающие участие в образовании водородных связей, могут быть зарегистрированы титрованием после денатурации. Кроме того, изоэлектрическая точка может быть установлена путем определения минимума растворимости в

различных буферных растворах, электрофорезом при различных рН или электрофокусированием в градиенте рН, образованном амфолитами. У белков, содержащих много основных аминокислот, изоэлектрические точки находятся в щелочной, а у богатых аминокислотными кислотами белков — в кислой области рН. В табл. 3-6 приведены изоэлектрические точки некоторых белков.

Таблица 3-6. Изоэлектрические точки некоторых белков

Белок	Изоэлектрическая точка
Пепсин	1,0
Яичный альбумин	4,59
Сывороточный альбумин	4,8
Коллаген	6,7
β -Лактоглобулин	5,2
α_1 -Глобулин (человека)	5,8
α_2 -Глобулин (человека)	7,3
Гемоглобин (человека)	7,07
Гемоглобин (лошади)	6,92
Миоглобин	7,0
Цитохром с	10,6
Уреаза	5,0
Химотрипсинаген	9,5
Рибонуклеаза	9,6
Лизоцим	11,6
Протамин	11,8

Изоэлектрическая точка зависит от ионной силы и вида применяемого буфера, так как нейтральные соли оказывают влияние на степень ионизации ионогенных групп боковых цепей.

белок — катион \rightleftharpoons белок — цвиттер-ион \rightleftharpoons белок — анион

На этих равновесиях основано физиологически важное буферное действие белков. Гемоглобин, например, играет важную роль в стабилизации рН крови. Нормальное значение рН крови лежит между 7,35 и 7,40, изменение этой величины на 0,3 — 0,5 единицы опасно для жизни.

3.5.2. Растворимость

Растворимость белка, помимо рН раствора, природы растворителя (диэлектрическая проницаемость), концентрации электролита (ионная сила) и вида противоиона, несомненно зависит от структурных особенностей моле-

кулы данного белка. Уже говорилось о различной растворимости глобулярных и фибриллярных белков, на которой основан классический принцип их подразделения, и о снижении растворимости белков при добавлении нейтральных по отношению к белку солей или растворителей.

Большое значение для растворимости белка имеет концентрация электролита. Белки с ярко выраженным асимметрическим распределением заряда, как, например, сывороточные глобулины, требуют для растворения или стабилизации раствора определенной концентрации соли. Этот солевой эффект основан на снижении ассоциации или агрегации белковых молекул, вызванном присоединением низкомолекулярных противоионов. Результатом являются повышенная гидратация и улучшение растворимости белка, его реассоциация при этом затруднена. Высаливание, ведущее к осаждению белка, основано на понижении гидратации белка за счет гидратации ионами электролита. Так как для различных белков необходима различная высаживающая концентрация электролита, высаливание относится к важным и удобным методам грубого фракционирования белков.

3.5.3. Денатурация [66]

Денатурация — любые вызванные физическими и химическими воздействиями изменения, которые при сохранении первичной структуры белка сопровождаются большей или меньшей потерей его биологической активности и других индивидуальных свойств белка. При денатурации ослабляются гидрофобные взаимодействия, разрываются водородные связи, а в присутствии восстановителей и дисульфидные связи. Денатурация с разрывом невалентных связей обычно обратима. Путем образования новых невалентных связей, а также благодаря взаимодействию с денатурирующим веществом новая конформация стабилизируется. Возникающее метастабильное состояние при восстановлении физиологических условий может вернуться к нативной конформации (*ренатурация*). Принципиально возможна ренатурация и при восстановительном расщеплении дисульфидных связей (рис. 3-8).

При произвольном дисульфидном обмене, неспецифическом окислении и при образовании ковалентных связей иного вида *денатурация необратима*. Тепловая денатурация в начальной стадии ведет, например, к региоселективным изменениям конформации, которые могут быть *обратимыми*. На последующей стадии неконтролируемая агрегация ведет к образованию неупорядоченного клубка.

Переход от нативного состояния с минимальной энергией к неупорядоченной денатурированной форме сопровождается увеличением энтропии. Но конечно, одновременно повышается упорядоченность окружающих молекул воды, поскольку происходит дополнительная гидратация освобождающихся гидрофобных групп боковых цепей, так что этот эффект в значительной степени компенсируется. При денатурации меняются и другие свойства белковой молекулы: уменьшаются растворимость и способность кристаллизоваться из-за появления дополнительных ионизируемых групп,

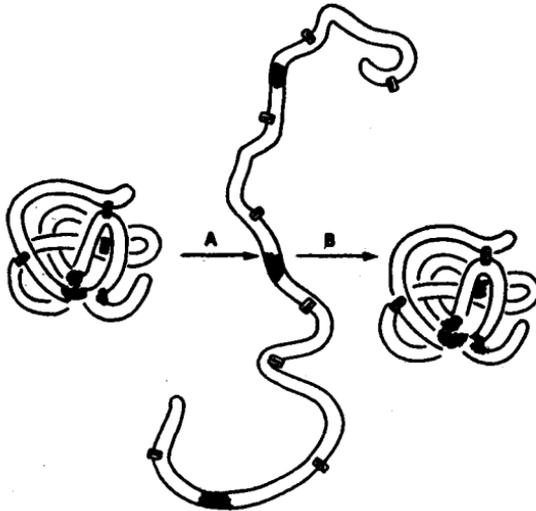


Рис. 3-8. Денатурация и ренатурация на примере панкреатической рибонуклеазы (по Анфинсену).

объясняемого разворачиванием пептидных цепей; сдвигается изоэлектрическая точка; повышается вязкость; увеличивается из-за освобождения фенольных гидроксильных групп поглощение в УФ-области.

Физически денатурация может быть вызвана механическими (сильное перемешивание, встряхивание) или физическими воздействиями (нагревание, ультрафиолетовое, рентгеновское и радиоактивное облучение, обработка ультразвуком и абсорбция на границе раздела). Химическая денатурация достигается прежде всего с помощью соединений, разрывающих водородные связи (6 — 8 М раствор мочевины, 4 М раствор гидрохлорида гуанидина), обработкой кислотами и щелочами ($3 < \text{pH} < 9$), а также воздействием поверхностно-активных веществ, например, 1%-ным раствором додецилсульфата натрия. Чувствительность отдельных белков к денатурирующим средствам различна.

3.5.4. Молекулярная масса

Молекулярные массы белков, состоящих из одной полипептидной цепи, лежат в интервале от 10 000 до 100 000, для большинства многоцепочечных (олигомерных) белков — от 50 000 до многих миллионов.

Для определения молекулярной массы и одновременно формы молекулы подходят различные физико-химические методы, которые грубо можно подразделить на кинетические и равновесные. *Кинетические методы* основаны на оценке процесса переноса частиц, например определение вязкости,

измерение скоростей седиментации и диффузии в ультрацентрифуге и определение электрофоретической и гель-хроматографической подвижности при использовании декстрановых и полиакриламидных гелей с определенным размером пор. При *равновесных методах* растров белка находится в термодинамически равновесном состоянии.

К равновесным методам относятся измерение светорассеяния и осмотического давления, а также метод малоуглового рентгеновского рассеяния.

Метод измерения светорассеяния основан на том факте, что с увеличением размера частиц эффект Тиндаля в растворе белка сильно возрастает. С помощью фотометра для рассеянного света измеряется соотношение интенсивностей падающего и рассеянного под углом 45° или 90° света. В идеальных условиях разность светорассеяния чистого растворителя и раствора белка прямо пропорциональна числу и размеру молекул белка.

Осмотическое давление определяется с помощью мембранных осмометров, причем для белков граница определяемых молекулярных масс лежит вблизи 20 000. Ниже этой границы применение мембранных осмометров проблематично, для этой области лучше подходит осмометр, основанный на измерении давления паров. В случае мембранных осмометров разность высоты столбиков жидкости в сравнительном и измерительном капиллярах показывает величину осмотического давления. При применении динамического принципа измерения, при котором определяется и автоматически компенсируется поток растворителя через полупроницаемую мембрану, время определения существенно сокращается.

При определении молекулярных масс в *ультрацентрифуге* [67 — 69] различают метод измерения скорости седиментации и равновесное центрифугирование. В то время как в первом случае измеряют скорость седиментации, во втором — определяют положение седиментационного равновесия.

В случае измерения *скорости седиментации* необходимы поля центробежных сил, обеспечивающие полное осаждение белков. Белок, находящийся в виде коллоидного раствора, обладает большей плотностью, чем растворитель. В ходе центрифугирования на молекулу белка действует значительная центробежная сила, которая, вызывая движение молекулы через среду, обеспечивает скорость перемещения, пропорциональную трению молекулы в среде. Скорость седиментации прямо пропорциональна молекулярной массе. Для определения молекулярной массы необходимы приборы со скоростью вращения ротора до 60 тыс. об/мин. Раствором белка заполняют прозрачную ячейку. Изменения концентрации, возникающие в процессе центрифугирования, могут прослеживаться с помощью оптических методов, например посредством шлирен- или интерференционной оптики, а также посредством прямого измерения абсорбции в УФ-области (сканирующая система).

Определение молекулярной массы с помощью аналитической ультрацентрифуги основано на работах Сведберга, шведского химика, специалиста в белковой химии, разработавшего в 1925 г. центрифугу. Молекулярная масса может быть вычислена по следующей формуле:

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \rho_L V_{\text{Prot}})}$$

где s — коэффициент седиментации (имеет размерность времени; единица измерения коэффициента седиментации называется сведбергом; $s = 1 \cdot 10^{-13}$ с); R — газовая постоянная; T — температура в кельвинах; $V_{\text{рот}}$ — парциальный удельный объем белка; ρ_L — плотность растворителя; D — коэффициент диффузии.

Парциальный удельный объем белка $V_{\text{рот}}$ может быть получен измерением плотности. Для того чтобы найти молекулярную массу, необходимо еще знать коэффициент диффузии D , который для сферической молекулы можно вычислить теоретически. Однако реальные молекулы имеют форму, отличающуюся от сферы, поэтому коэффициент диффузии определяют экспериментально центрифугированием белка при меньшем числе оборотов и измерением вызванного диффузией уширения границы между белковой зоной и раствором.

При определении молекулярной массы по методу *седиментационного равновесия* знание коэффициента диффузии не является необходимым. В этом случае используют более низкое число оборотов. По сравнению с предыдущим методом, для которого необходимо гравитационное поле до 400 000 g, здесь достаточно центробежной силы, в 10 — 15 тыс. раз превосходящей земное притяжение. Через несколько часов или через несколько суток процесс седиментации и обратной диффузии достигает состояния равновесия, при котором перемещение частиц отсутствует. Измерив градиент концентрации белка от мениска до дна ячейки, можно вычислить его молекулярную массу. Медленное установление равновесия — недостаток метода. Этого можно избежать при проведении определения по Арчибальду. В этом «низкоскоростном» методе для расчетов можно использовать градиент концентрации, образующийся в измерительной ячейке у мениска жидкости (до отделения белковой зоны). Метод нулевой концентрации в мениске, предложенный в 1964 г., делает возможным достижение седиментационного равновесия при высокой скорости ротора (высокоскоростной метод), в этом случае белковая зона уже отделена от мениска. Это дает возможность сократить время эксперимента до 2 — 4 ч.

Следует также упомянуть метод *центрифугирования в градиенте плотности*. Обычно работают в возрастающем градиенте плотности сахарозы при высокой скорости ротора. Расстояние, на которое перемещается белок в градиенте, обратно пропорционально его молекулярной массе. Молекулярную массу неизвестного белка с достаточной точностью можно определить, сравнивая его с добавленным стандартным белком известной молекулярной массы.

При определении молекулярной массы с помощью *гель-фильтрации* [70, 73] применяют сефадексы различного типа (G-50, G-100, G-150, G-200), агарозы (сефарозы 2В, 4В, 6В) или полиакриламиды (биогели Р-100, Р-150, Р-300). Процесс проводят как в хроматографических колонках, так и на тонкослойных пластинках. Принцип метода уже рассматривался в разд. 3.3.

При помощи градуировочной кривой, полученной при элюировании стандартных белков с различной молекулярной массой, и используя простейшее аппаратное оформление, можно провести определение молекулярной массы с погрешностью 5 — 10%.

Об эффективности гель-фильтрации можно судить по рис. 3-9.

Молекулярную массу белков можно также определять посредством *гель-электрофореза в полиакриламиде* [41]. Мономеры, предназначенные для образования геля, растворяют в буфере и полимеризуют в стеклянных трубках или между пластинками при использовании в качестве сшивающего агента бисакриламида. Большая разделяющая способность метода объясняется молекулярно-ситовым эффектом.

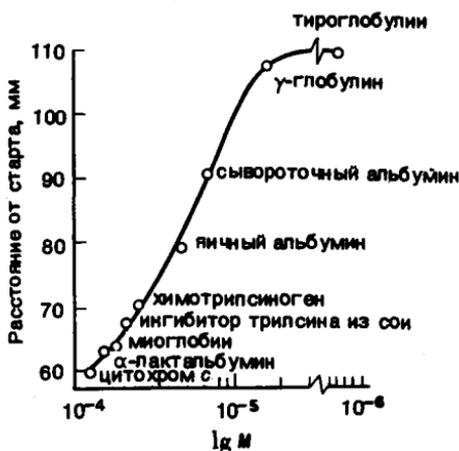


Рис. 3-9. Определение молекулярной массы методом тонкослойной гель-фильтрации.

Электрофорез проводят в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Таким путем можно определить молекулярные массы субъединиц олигомерных белков [74 — 76]. Молекулы ДСН образуют за счет гидрофобного взаимодействия комплексы с полипептидными цепями, характеризующиеся постоянным отношением ДСН : белок. Тогда электрофоретическую подвижность можно выразить как функцию молекулярной массы и сравнить с подвижностью стандартного белка. Метод отличается высокой скоростью (2 — 4 ч) и требует для одного определения, как правило, лишь 10 — 50 мкг белка. В последнее время ДСН-электрофорез проводят также на стеклянных шариках с контролируемым размером пор (120 — 200 нм). Комплекс ДСН — белок не адсорбируется на носителе, интервал определяемых молекулярных масс 3 500 — 12 000 [77].

Из-за зависящей от концентрации тенденции многих белков к агрегации или диссоциации на субъединицы определение молекулярных масс становится проблематичным, интерпретация результатов различных физико-химических методов часто также является сложной. Обычно суммируют значения для различных фракций и затем делят полученную величину на число частиц в растворе или относят среднюю величину не к числу, а к средней массе частиц. Метод ультрацентрифугирования позволяет найти среднюю молекулярную массу.

3.5.5. Форма молекул

Существуют различные методы определения формы молекул. Величиной, характеризующей форму молекулы белка, является соотношение осей f/f_0 (как уже было сказано, почти все белки имеют форму, отличную от сферы):

$$f/f_0 = a / \left(\frac{3V_{\text{Prot}} \cdot M}{4\pi N} \right)^{1/3}$$

где f — молярный коэффициент трения, f_0 — коэффициент трения для идеальной сферической молекулы, a — стоксовский радиус, N — число Авогадро, V_{Prot} — парциальный удельный объем белка, M — молекулярная масса.

При экспериментах по ультрацентрифугированию из константы седиментации при знании стоксовского радиуса можно вычислить отношение осей f/f_0 . Под стоксовским радиусом понимают радиус молекулы при наименьшей площади ее поперечного сечения. Он может быть получен из гель-хроматографической константы эксклюзии (r — эффективный диаметр пор):

$$K_D = (1 - a/r)^2 \{1 - 2,104(a/r) + 2,09(a/r)^3 - 0,95(a/r)^5\}$$

Отношение осей белковой молекулы, форма которой охарактеризована как эллипсоид вращения, для большинства глобулярных белков лежит в интервале между 2 и 30, в то время как для фибриллярных белков это соотношение > 30 .

Форма молекулы может быть также определена путем измерения вязкости, а также методом двойного лучепреломления в потоке. С помощью электронной микроскопии возможно прямое определение формы молекулы. При этом пользуются методом негативного контрастирования при применении тетраоксида осмия или других тяжелых металлов в качестве контрастирующих средств.

3.6. Принципы структурной организации белковых молекул

По рекомендации Линдерстрема — Ланга были введены термины «первичная, вторичная и третичная структура», характеризующие уровни структурной организации белков. *Первичная структура* белка дает сведения о числе и последовательности связанных друг с другом пептидной связью аминокислотных остатков. *Вторичная структура* описывает конформацию полипептидной цепи, возникающую при образовании водородных мостиков между карбоксильными кислородными атомами и атомами амидного азота в составе скелета молекулы. Под *третичной структурой* понимают трехмерную укладку полипептидной цепи, вызванную внутримолекулярным взаимодействием боковых цепей.

Введенный в 1958 г. Берналом термин *четвертичная структура* охватывает наблюдающийся у ряда белков процесс ассоциации нескольких интактных полипептидных цепей в определенный молекулярный комплекс. В этом случае связывание обеспечивают межмолекулярные взаимодействия. Вторичная, третичная и, если есть, четвертичная структуры в сумме дают *конформацию* белка.

Этот чисто академический принцип подразделения не следует переоценивать. Спорна прежде всего дифференциация вторичной и третичной

структур, поскольку в обоих случаях конформация поддерживается нековалентными связями. Но все-таки такое подразделение правомерно хотя бы потому, что изменение элементов вторичной структуры протекает намного быстрее, чем структурные перестройки третичной структуры.

Правила структурной организации глобулярных белков рассмотрены Шульцем [81]*. Согласно им, в структуре таких белков следует выделять большее число уровней организации. Иерархия берет свое начало от аминокислотной последовательности. Затем следует вторичная структура с регулярной укладкой полипептидной цепи, характеризующейся максимальным образованием водородных связей. Вторичная структура может образовывать до 75% всей полипептидной цепи. Иногда в молекуле белка можно выделить *агрегаты вторичной структуры* (сверхвторичная структура), являющиеся регулярными образованиями из нескольких участков полипептидных цепей, например двойная α -спираль или складчатый лист-спираль. Пример более высокой ступени организации глобулярных белков — *образование доменов*. Они возникают у крупных белков и характеризуются как независимые пространственные структуры. Иммуноглобулины, например, образуют при соответствующем сворачивании полипептидных цепей от 2 до 4 доменов. В химотрипсине активный центр находится внутри, между двумя доменами. В данном случае домены имеют структуру складчатого листа-цилиндра и связаны один с другим лишь одной полипептидной цепью. И наконец, глобулярные белки, построенные из нескольких доменов, могут упаковываться в еще более крупные структурные образования. Возникающие при этом агрегаты обычно построены симметрично, причем структура входящих в их состав мономеров, вероятно, не меняется.

3.6.1. Первичная структура

Установление первичной структуры начинается с определения аминокислотного состава и молекулярной массы выделенного и очищенного белка. Белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей, разделяются с помощью денатурирующих реагентов (концентрированный раствор мочевины или ДСН) на мономеры. Дисульфидные мостики расщепляются восстановлением меркаптоэтанолом. Для предотвращения дисульфидного обмена и окисления образующихся свободных меркаптогрупп их блокируют каким-либо методом, например алкилированием иодуксусной кислотой с образованием S-карбоксиметильного производного или цианэтилированием акрилонитрилом. После определения N- и C-концевых аминокислот полипептидная цепь расщепляется химически или ферментативно (в нескольких вариантах) на меньшие перекрывающиеся фрагменты. Для каждого фрагмента устанавливается аминокислотная последовательность. И наконец, комбинируя отдельные последовательности, приходят к полной последовательности исходной полипептидной цепи.

К настоящему времени опубликовано свыше 15 000 работ о первичных структурах более 1 000 белков. Все известные первичные структуры заре-

* См. также книгу: Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Прим. ред.

гистрированы в «Атласе белковых последовательностей и структур» [83]. Методические основы анализа первичной структуры разработаны Сенгером с сотр. в 1945 — 1954 гг.

3.6.1.1. Селективное расщепление полипептидных цепей

Расщепление пептидной цепи, необходимое для определения последовательности аминокислот, осуществляют с помощью частичного химического или ферментативного гидролиза. При *ферментативном расщеплении* чаще всего используют протеазы: трипсин, химоотрипсин, пепсин, папаин, субтилизин, эластазу и термоллизин [84].

Трипсин расщепляет пептидные связи, в которых карбоксильная функция представлена лизином или аргинином. Селективность расщепления может быть повышена блокированием боковых цепей лизина (Z-, Tfa- или Dnp-остатки на ϵ -аминогруппе) или аргинина (циклогександионовое производное по гуанидиновой группе) [85]. Блокированные остатки не затрагиваются, и, таким образом, расщепление идет селективно либо по лизину, либо по аргинину. Цистеин также может быть включен в триптическое расщепление, если модифицировать меркаптогруппу этиленмином. Образующееся S- β -аминоэтильное производное структурно похоже на лизин, и пептидная цепь расщепляется со стороны его карбоксила.

Химоотрипсин преимущественно расщепляет те пептидные связи, карбоксильная функция которых относится к ароматическим аминокислотам. В длинных полипептидных цепях гидролизуются также связи, образованные лейцином, валином, аспарагином и метионином. Пепсин обладает слабо выраженной специфичностью. Расщепляются связи, образованные триптофаном, фенилаланином, тирозином, метионином и лейцином.

Субтилизин прежде всего расщепляет связи по соседству с серином, глицином и ароматическими аминокислотами. *Эластаза* менее специфична и преимущественно гидролизует связи нейтральных аминокислот. Основными точками воздействия малоспецифичного *папаина* являются остатки аргинина, лизина и глицина, кислые аминокислоты не затрагиваются. *Термоллизин* предпочтительно расщепляет полипептидную цепь по аминокислотным остаткам с гидрофобной боковой цепью.

В общем случае ферментативный гидролиз протекает тем специфичнее, чем короче время инкубации с протеазой. При этом большое значение имеет чистота выбранного фермента. Для удаления из трипсина последних остатков химоотрипсина применяют, например, селективно ингибирующие вещества, такие, как дифенилкарбамилхлорид или L-(1-тозиламидо-2-фенил)-этилхлорметилкетон.

Расщепление полипептидных цепей, содержащих дисульфидные мостики, обычно приводит к сложной смеси низших пептидов. При реконструкции полипептидной цепи установление исходного порядка дисульфидных связей — довольно трудная задача. Один из путей ее решения дает диагональный электрофорез по Хартли, при котором пептиды после ферментативного гидролиза сначала разделяют электрофоретически на полосе бумаги.

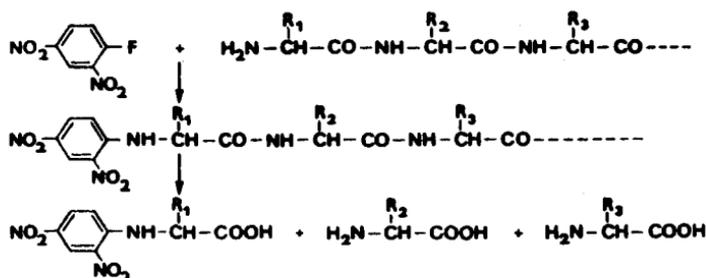
3.6.1.2. Установление аминокислотной последовательности [92 — 95]

Помимо приведенных далее методов следует сослаться (разд. 2.3.1.1. и 3.8.4.5) на возможность установления аминокислотной последовательности анализом соответствующей белку мРНК. Этот путь приобрел значение благодаря достижениям в определении первичной структуры нуклеиновых кислот (Фредерик Сенгер, Нобелевская премия за 1980 г.).

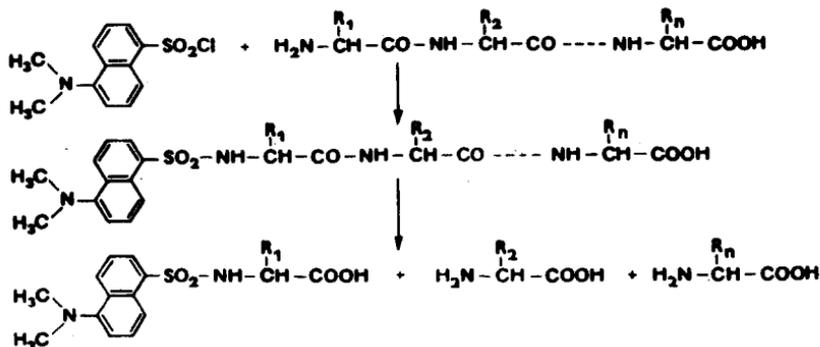
3.6.1.2.1. Определение концевых аминокислот

Химические методы определения концевых остатков основаны главным образом на превращении или модификации концевых аминокислот. После полного гидролиза производные концевых аминокислот отделяются от остальных немодифицированных аминокислот и идентифицируются.

Наиболее известен *динитрофенильный метод Сенгера* [97]. В этом методе пептид или белок обрабатывается 2,4-динитрофторбензолом (реагент Сенгера) и образующаяся в результате гидролиза ДНФ-аминокислота экстрагируется и идентифицируется.



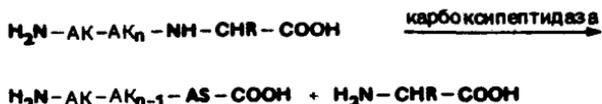
Значительно чувствительнее *дансильный метод* (5-диметиламино-нафтилсульфонильный метод) [98], в котором N-концевая аминокислота идентифицируется после тонкослойной хроматографии в виде интенсивно флуоресцирующего желтым светом пятна дансильного производного. Предел обнаружения 10^{-14} моль.



Другими, однако, менее важными методами блокирования N-концевой аминокислоты являются арилсульфонирование при взаимодействии с нафтил- или бензолсульфохлоридом, карбамилирование цианатом калия, карбоксиметилирование бромуксусной кислотой и др.

И наконец, определение N-концевой аминокислоты может быть принято с помощью *лейцинаминопептидазы*.

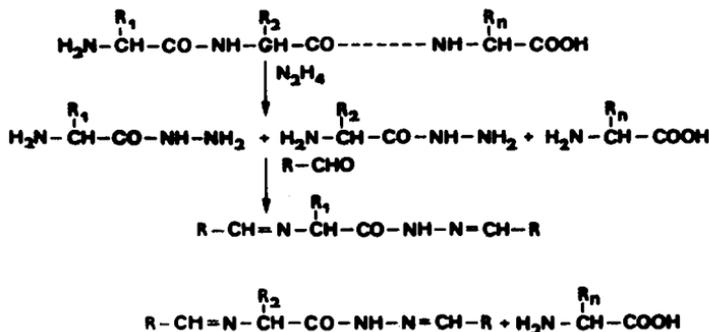
Для определения C-концевой аминокислоты используют чаще всего экзопептидазы — карбоксипептидазы А, В и У.



Специфичность обеих экзопептидаз различна. Карбоксипептидазой А, впервые использованной Ленсом в 1949 г. для определения C-концевых остатков в инсулине, отщепляются все аминокислоты, кроме Lys, Arg, Pro и His. Карбоксипептидаза В отщепляет Lys, Arg, Orn и S-аминоэтилцистеин. Оба фермента взаимно дополняют друг друга и, как правило, применяются в комбинации.

Карбоксипептидаза У из дрожжей обладает широкой специфичностью и отщепляет все аминокислоты, кроме Gly, связанного с Pro.

Из химических методов определения C-концевой аминокислоты наибольшее значение имеет *метод Акабори* [99]. При кипячении с безводным гидразином (100 °С, 5 ч) все аминокислоты, за исключением C-концевой, превращаются в гидразиды. Отделение значительного избытка гидразидов аминокислот осуществляется реакцией с изовалернаноным (или другим) альдегидом. Можно также смесь, полученную непосредственно после гидразинолиза, обработать динитрофторбензолом и после подкисления выделить ДНФ-аминокислоту.



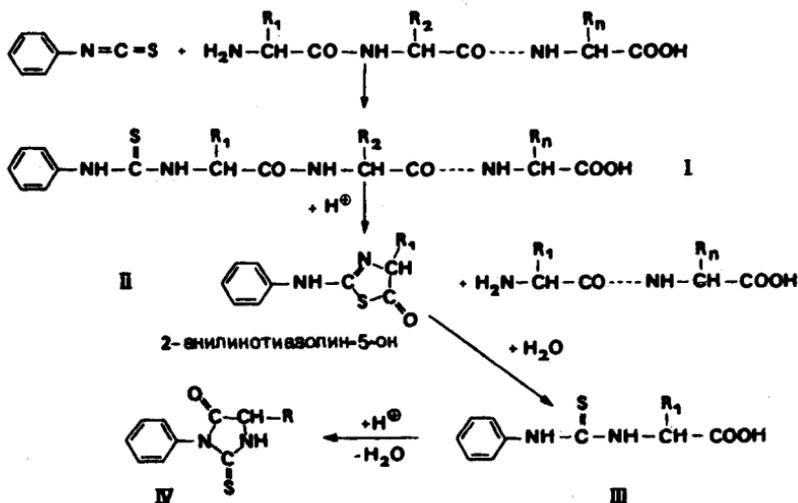
Этим методом не могут быть определены C-концевые цистеин, глутамин, аспарагин и триптофан; аргинин частично превращается в орнитин.

Другой метод определения С-концевой аминокислоты основан на восстановлении концевой карбоксильной группы литийалюминийгидридом. Белок перед восстановлением полезно этерифицировать диазометаном. Полный гидролиз дает легко выделяемый и идентифицируемый аминокислотный спирт, соответствующий С-концевому остатку аминокислоты.

3.6.1.2.2. Ступенчатая деградация полипептидной цепи

3.6.1.2.2.1. Химические методы

Важнейший химический метод ступенчатой деградации пептидов с N-конца — фенилтиогидантоиновый метод (деградация по Эдману) [100].



При обработке пептида фенилизотиоцианатом при pH 9 и 40 °C сначала образуется производное тиомочевины (I), которое в кислой среде расщепляется на 2-анилинотиазолин-5-он (II) и пептид, укороченный на одну аминокислоту. Относительно нестабильный тиазолион непригоден для идентификации. Он гидролизуется в фенилтиокарбаминную кислоту (III), переходящую с замыканием кольца в 3-фенил-2-тиогидантоин (ФТГ-аминокислота) (IV). Прямая изомеризация тиазолиона в тиогидантоин происходит при нагревании в кислой среде. Образующиеся ФТГ-аминокислоты IV экстрагируют и идентифицируют с помощью бумажной, тонкослойной или газовой хроматографии. Количественное определение осуществляется спектрофотометрически при 268 — 270 нм. Оставшийся пептид выделяется и подготавливается к следующему циклу деградации.

Идентификацию ФТГ-аминокислот можно также осуществить с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [101 — 103]. Время проведения одного процесса хроматографического разделения составляет 7 мин; метод характе-

ризует высокая достоверность, причем работают на нанограммовом уровне. Работают на колонках с SiO_2 при применении давления и градиента растворителей.

Особо чувствительным методом определения фенол- и метилтиогидантоинов аминокислот является масс-спектрометрия [104 — 106]. В качестве окрашенного реагента для деградации предложен 4'-N,N-диметиламиноазобензол-4-изотиоцианат [107].

Другими вариантами ступенчатой деградации являются комбинация метода Эдмана с дансилным методом [108 — 110], микроопределение на фильтровальной бумаге, тонкослойная хроматография на полиамидных слоях и конденсация с пентафторфенилизотиоцианатом. В противоположность фенилизотиоцианату фторпроизводное допускает применение при газохроматографическом определении тиогидантоинов детектора с электронным захватом [111].

Принципиально деградация по Эдману при непрерывном повторении циклов возможна вплоть до С-конца. Однако на практике возможно определение последовательности примерно 10 аминокислотных остатков, так как отщепление протекает не всегда количественно, а дополнительное неспецифическое расщепление пептидной цепи вносит ошибку в результаты. Решить проблему удалось Эдману и Беггу [112, 113] одновременно с автоматизацией процесса. На рис. 3-10 приведена принципиальная схема так называемого белкового секвенатора. В отличие от неавтоматизированного варианта здесь нестабильный 2-анилиногтазолин-5-он автоматически переносится в коллектор фракций и затем, вне реакционной ячейки, превращается в ФТГ-аминокислоту.

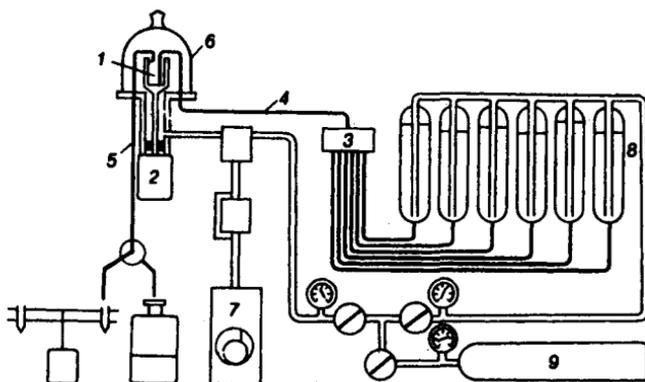


Рис. 3-10. Схема коммуникаций жидкофазного секвенатора белков [112, 113].

*В настоящее время для разделения ФТГ-аминокислот, как правило, используют сорбенты на основе SiO_2 , модифицированного октильными или октадецильными группами. — Прим. перев.

Реакционный сосуд 1 представляет собой цилиндрический, термостатируемый при 50 °С стеклянный стакан, вращаемый электромотором 2 со скоростью 1425 об/мин. Раствор, находящийся в ячейке, под действием центробежных сил распределяется на поверхности в виде тонкой пленки. Необходимые реагенты и растворители, подача которых регулируется краном 3, поступают по специальной трубке 4 на дно вращающегося стеклянного стакана, раствор после экстракции удаляется из реакционного сосуда через боковую трубку 5. Такая конструкция позволяет осуществить все необходимые операции: растворение, упаривание, вакуумную сушку и экстракцию. При этом каждый раз укорачиваемая на одну аминокислоту полипептидная цепь всегда остается в реакционной ячейке. Стеклянный цилиндр закрыт стеклянным колпаком 6 и может вакуумироваться вакуумным насосом 7. Реагенты и растворители находятся в соответствующих сосудах для хранения 8, находящихся под давлением азота. Разность в давлениях между сосудами и реакционной камерой позволяет осуществлять непрерывную подачу в реакционный сосуд желаемых реагентов и растворителей.

Цикл, необходимый для отщепления одной аминокислоты, включает ~30 операций и продолжается 93,6 мин. Таким образом за 24 ч удается отщепить и идентифицировать около 15 аминокислотных остатков. Так как выход на цикл составляет 97 — 98%, теоретически возможно при данных условиях ступенчато отщепить до 100 аминокислот. Для небольших пептидов «классический» автомат подходит меньше, так как недостаточное различие растворимостей пептида и тиазолона затрудняет селективную экстракцию последнего.

Лишь модификация процесса, осуществленная Браунцером и др. [114, 115], сделала возможным полное ступенчатое расщепление полипептидной молекулы вплоть до С-концевой аминокислоты. Введенные в ϵ -аминогруппы боковых цепей остатков лизина, входящих в состав пептидов триптического расщепления, гидрофильных остатков нафталинсульфокислоты была снижена вымываемость даже коротких пептидов и тем самым обеспечены условия работы на секвенаторе. В дополнение к такой модификации может быть предпринята деградация по *квадрольному методу* [116]. Квадрол [N, N, N', N'-тетраakis-(2-гидроксипропил)этилендиамин], хорошо растворяющий модифицированные белки, рекомендован в качестве буферного вещества для реакции Эдмана. Но обычно его применение ведет к преждевременному окончанию деградации из-за сильной вымываемости коротких пептидов.

Альтернативным путем для установления последовательности коротких пептидов является *деградация по Эдману на твердой фазе*. По аналогии со способом Меррифилда деградируемый пептид связывается ковалентно с полимерным носителем и ступенчато расщепляется с N-конца. Принципиальная применимость этого метода доказана во многих лабораториях. В качестве носителя чаще всего используют устойчивый к трифторуксусной кислоте аминоалкилполистирол. Присоединение секвенируемого пептида более предпочтительно через амидную связь.

Первый твердофазный секвенатор предложен в 1970 — 1971 гг. Лоурсеном [117, 118]. Он значительно дешевле, чем секвенатор Эдмана, и подходит для работы с

пептидами, имеющими до 30 остатков. Все реакции деградации проходят в термостатируемой колонке.

Реагенты и растворители, скорость подачи которых регулируется с помощью клапанов, прокачиваются через колонку. Продукты реакции на каждом шаге деградации собираются коллектором фракций. Всеми операциями управляет программирующее устройство.

Секвенирование на твердой фазе затрудняется присутствием в пептиде карбоксильных групп (образование циклических имидов, прекращение процесса, если амидная связь образована через β - или γ -карбоксильные группы) [119, 120]. Для решения этой проблемы Лоурсен [121] предложил связывать с носителем лизинсодержащие триптические пептиды через ϵ -аминогруппу с помощью бифункциональных реагентов, например *l*-фенилендинзотиоцианата, или проводить связыванием с носителем после предварительного блокирования карбоксильных групп [122].

Помимо этого существуют другие возможности удерживания на носителе анализируемого триптического фрагмента белка [123, 124]. Так, Ниллс с сотр. [125] применил в качестве носителя для автоматического секвенирования на наномольном уровне синтетические полиаминокислоты типа $H-(\text{Norleu-Arg})_{27}\text{-NH}_2$.

В некоторых других твердофазных секвенаторах в качестве носителя применяется 3-аминопропилстекло [126]. Введение аминогрупп осуществляется обработкой 3-аминопропилтриэтоксисилоном. Полипептидные цепи фиксируются на 3-аминопропилстекле после активации карбоксильных групп подходящим методом либо в случае лизинсодержащих пептидов с помощью *l*-фенилендинзотиоцианата. Модифицированные носители на основе стекла отличаются постоянной емкостью при присоединении пептидов и хорошей проницаемостью для потока жидкости в колонке. Лоудон и Пархам [127] предложили использовать в качестве носителя пористое стекло с определенным размером пор (CPG-стекло), содержащее карбоксильные группы, активированные *N*-гидроксисукцинимидом и способные присоединять пептиды с образованием амидных связей. Деградация по Эдману пептида, адсорбированного на поверхности оксида алюминия за счет ионных связей, предложена Виландом и сотр. В качестве реагента для секвенирования предложен изотиоцианат бензолсульфокислоты. Манеке и Гюнцель предложили полимерный деградирующий реагент — полизотиоцианат. Введенный Штарком [128] метод тиоцианатного расщепления с *S*-конца был использован в твердофазном варианте [129]. С его помощью удалось идентифицировать последние 6 аминокислот рибонуклеазы.

О достижениях техники разделения при анализе последовательностей белков и пептидов сообщается в обзоре [130].

3.6.1.2.2.2. Ферментативные методы

В разд. 3.6.1.2.1 отмечалось, что карбоксипептидазы А, В и Y преимущественно используются для определения *S*-концевых аминокислот. Однако при более длительном воздействии пептидная цепь может быть путем отщепления отдельных аминокислот деградирована с *S*-конца. Для этого необходимы определенные предпосылки. Фермент не должен содержать активных

происходит в процессе или сразу после окончания биосинтеза белка (разд. 3.7.3). За их стабилизацию помимо ковалентных пептидных и дисульфидных связей ответственны прежде всего нековалентные взаимодействия боковых радикалов аминокислот.

3.6.2.1. *Пространственное расположение полипептидной цепи*

Для установления вторичной и третичной структур химические методы неприменимы. Для этой цели преимущественно применяют рентгеноструктурный анализ, причем из получаемой дифракционной картины рассчитывают распределение электронных плотностей в кристалле белка. Точное установление пространственных структур белков стало возможным благодаря работам Полинга и Кори. На аминокислотах, их амидах и простых пептидах в основном с помощью рентгенографических исследований были определены длины связей и валентные углы. Оказалось, что пептидная связь в значительной степени обладает характером двойной связи. Она является планарной, поэтому в пептидной цепи на один аминокислотный остаток приходится лишь два места поворота. Одним является поворот вокруг C^{α} —N-связи (угол φ), другим — вращение вокруг оси C^{α} —C-связи (угол ψ). Значения φ и ψ для всех остатков аминокислот определяют пространственное расположение цепи.

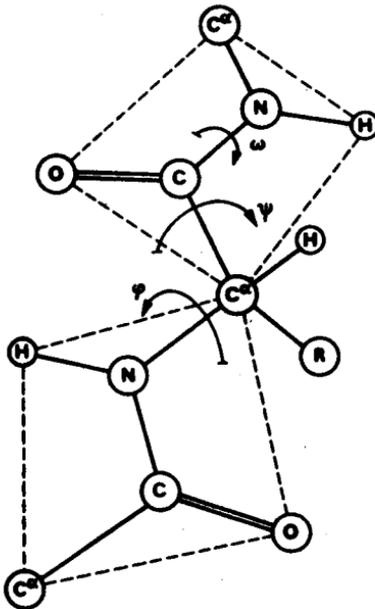


Рис. 3-11. Возможные углы поворота в полипептидной цепи.

Из планарности пептидной связи следует, что угол поворота $\omega = 0$ (рентгеноструктурными исследованиями белков была показана возможность незначительного поворота с выходом из планарности). По определению углы φ и ψ получают положительное значение, если, при наблюдении от C^α -атома, вращение осуществляется по часовой стрелке. Принципиально для этих углов разрешены не все значения; это ограничение определяется радиусами взаимодействия не связанных друг с другом атомов. Рамачандран и др. [148, 149] исследовали на различных моделях с помощью ЭВМ все возможные комбинации углов поворота φ и ψ (в табл. 3-7 приведены минимальные расстояния между ковалентно не связанными атомами, которые были взяты для расчетов стерически разрешенных и запрещенных конформаций белковой молекулы при отклонении ее от планарности амидной связи). Из-за стерических ограничений практически реализуется лишь 15% всех возможных значений φ и ψ .

Таблица 3-7. Минимальные расстояния (нм) между ковалентно не связанными атомами, полученные из ван-дерваальсовых радиусов (в скобках приведены минимальные расстояния по Рамачандрану)

	C	O	N	H
C	0,32 (0,30)	0,28 (0,27)	0,29 (0,28)	0,24 (0,22)
O		0,27 (0,26)	0,27 (0,26)	0,24 (0,22)
N			0,27 (0,26)	0,24 (0,22)
H				0,20 (0,19)

На φ, ψ -диаграмме (рис. 3-12) *транс*-пептидных конформаций Рамачандрана разрешенные комбинации углов φ и ψ лежат в заштрихованной области (расчет произведен с нормальными радиусами атомов; табл. 3-7). Используя минимальные контактные расстояния, разрешенную зону расширяют (ограничена штриховой линией), и в окрестностях точки $\varphi = \psi = 240^\circ$ появляется новая разрешенная область.

Комбинации разрешенных углов φ и ψ , рассчитанные Рамачандраном для модели из твердых сфер, соответствуют максимально устойчивым конформациям. Значительно влияют на стерически разрешенные конформации объемные боковые радикалы аминокислот. Приведенная на рис. 3-12 φ, ψ -диаграмма базируется на расчетах, сделанных для аланина. Для глицина разрешено значительно больше комбинаций углов, чем, например, для валина или изолейцина.

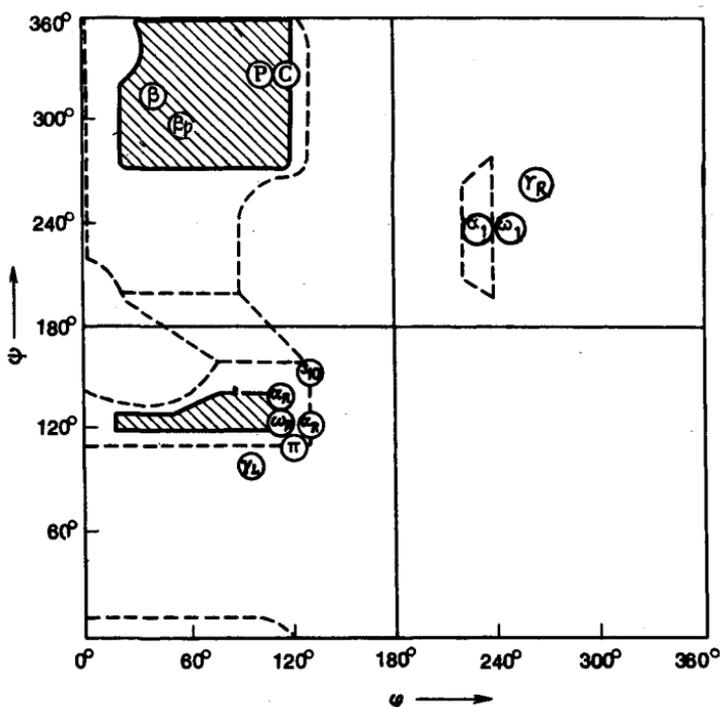


Рис. 3-12. Диаграмма разрешенных значений углов φ и ψ [148, 149].
 Обозначения: P — полипролиновая спираль; C — коллагеновая спираль; β — антипараллельная β -структура; β_p — параллельная β -структура; α_R и α_L — лево- и правовращающая α -спираль; ω_R и ω_L — лево- и правовращающая ω -спираль; γ_R и γ_L — лево- и правовращающая γ -спираль; 3_{10} — 3_{10} -спираль.

В 1951 г. Полинг [150, 151] разработал две относительно простые структурные модели, спиральную и складчатого листа, объясняемые исключительно планарностью пептидной связи и водородными связями между пептидными группами и образующие основу для построения высших структур. Модели нашли свое подтверждение в пространственно-структурных исследованиях Перутца [152].

Определение вторичной структуры белков возможно также с помощью лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния [153]. Установление вторичной структуры глобулярных белков с помощью ЭВМ открывает дальнейшие интересные возможности [154].

3.6.2.1.1. Спиральные структуры [155, 156]

Идентичность значений углов φ и ψ при каждом атоме пептидной связи в пептидной цепи неизбежно дает спираль с определенным числом n аминокислотных остатков на виток, характерной высотой h витка и определенным подъемом d на каждый остаток (рис. 3-13). Принимая во внимание планарность пептидной связи, величины n и d однозначно определяются из углов φ и ψ , а зная n и d , можно получить высоту витка спирали h .

Возможно существование нескольких различных спиральных структур, возникающих при образовании водородных связей между структурными элементами пептидной связи (NH- и CO-группы), из которых наиболее известна α -спираль (рис. 3-14) с параметрами: $n = 3,6$, $d = 0,15$ нм и $h = 0,54$ нм. В случае α -спирали за счет внутримолекулярных водородных связей образуется 13-членная кольцевая структура. Правильно назвать такую структуру можно так: $\alpha(3,6_{13})$ -спираль. Другими упорядоченными конформациями спирального типа для остова молекулы белка являются 3_{10} -спираль, $\pi(4,4_{16})$ -спираль и $\gamma(5,1_{17})$ -спираль.

В глобулярных белках доминирует правовращающая α -спираль, кроме того, в отдельных белках (гемоглобин, лизоцим) показано наличие 3_{10} -спирали. В α -кератине высота витка α -спирали меньше (0,51 нм), чем соответствующая величина (0,54 нм) в нормальной α -спирали.

Принципиально α -спираль может быть образована как L-, так и D-аминокислотными остатками. Склонность полипептидной цепи к образованию спиральной структуры в значительной степени зависит от природы боковых цепей аминокислот. Различают стабилизирующие спираль аминокислоты (Ala, Val, Leu, Phe, Trp, Met, His, Gln) и дестабилизирующие (Gly, Glu, Asp, Ile, Thr, Lys, Arg, Tyr, Asn, Ser). В случае кислых и основных аминокислот дестабилизирующее действие определяется наличием зарядов на боковых группах. В полиглутаминовой кислоте и полилизине, например, α -спираль образуется при pH 2 и 12 соответственно, т. е. при преобладании незаряженных боковых функциональных групп. При одноименно заряженных боковых группах силы отталкивания сильнее, чем прочность стабилизирующих водородных связей. В случае, изолейцина дестаби-

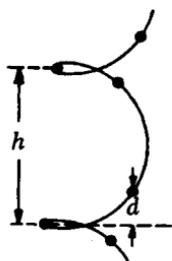


Рис. 3-13. Спираль с тремя остатками на виток (по Хаггеймайеру).

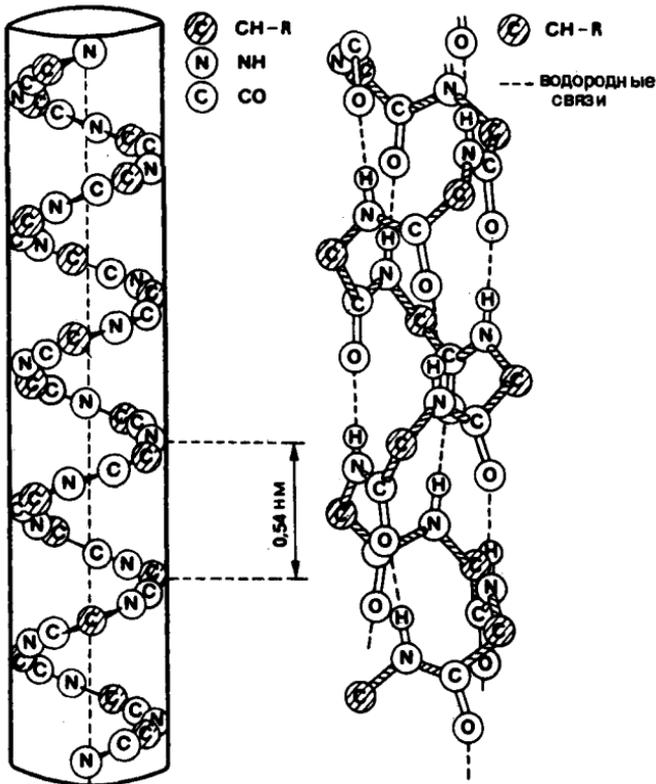


Рис. 3-14. Структура α -спирали (по Рапопорту).

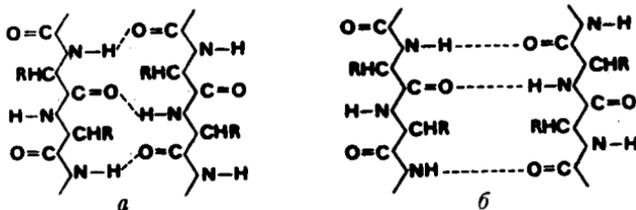
лизирующее действие объясняется стерическим эффектом. Наличие пролина всегда ведет к прерыванию спирали, образуемой полипептидной цепью (точка излома), так как в этом случае атом азота зафиксирован в составе пирролидинового кольца и не способен образовывать водородную связь. α -Спиральность полипептидной цепи может быть приблизительно определена сравнением удельного оптического вращения до и после денатурации. При денатурации белков наблюдается увеличение угла вращения влево.

3.6.2.1.2. Структура складчатого листа

Как и в спиральной структуре, максимальное замыкание водородных связей может достигаться между двумя идущими в противоположном направлении пептидными цепями. Стерические затруднения, вызванные боковыми группами, вынуждают пептидные группировки к повороту относительно

друг друга. Образующаяся структура называется структурой *складчатого листа* или β -структурой.

В зависимости от параллельности или антипараллельности хода двух соседних цепей различают два вида структур: *параллельную* (а) и *антипараллельную* (б) структуры складчатого листа.



Соседние полипептидные цепи, идущие в противоположном направлении, в пространственном представлении (рис. 3-15) обнаруживают «плиссированность», причем боковые радикалы аминокислотных остатков стоят попеременно с разных сторон складчатого листа. Штрихами показаны водородные связи. Соответствующие пары углов φ и ψ для параллельной и антипараллельной структур могут быть получены из рис. 3-12.

β -Структура присутствует в фибрине шелка. Она может также образовываться в различных белковых доменах, например в доменах карбоксипептидазы А и лизоцима.

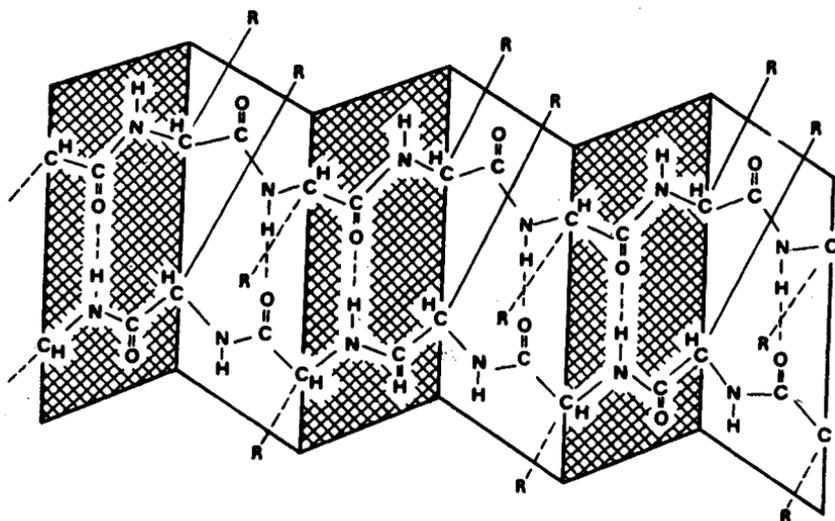


Рис. 3-15. Антипараллельная структура складчатого листа.

3.6.2.1.3. Неупорядоченные конформации полипептидной цепи

Как в случае спиральной структуры, так и структуры складчатого листа пары углов φ и ψ для всех аминокислотных остатков лежат в одной точке диаграммы Рамачандрана (рис. 3-12). Напротив, в случае неупорядоченной конформации эти пары углов для различных аминокислотных остатков не находятся в одной точке, а распределяются по разрешенной области диаграммы. Вследствие этого образуется огромное разнообразие конформаций, причем распределение всех комбинаций углов не является равномерным статистическим в математическом смысле. Ограничения возможных конформаций вытекают из взаимного расположения имеющихся боковых групп, а также из их взаимодействий с растворителем. По энергетическим причинам это приводит к предпочтению определенных локальных конформаций.

Неупорядоченные белковые конформации появляются при процессах денатурации, при переходах спираль — клубок, у синтетических полиаминокислот и др. Кинетические и теоретические проблемы переходов спираль — клубок освещены в обзорных работах [157, 158].

Это определение не следует переносить на конформации глобулярных белков. Например, у химотрипсина неупорядоченные области несравнимы со статистическим клубком. Более того, пары углов φ и ψ для каждого аминокислотного остатка принимают свои определенные значения.

3.6.2.1.4. Третичная структура глобулярных белков

До сих пор при рассмотрении периодических структурных элементов полипептидной цепи не принималось во внимание влияние боковых радикалов аминокислот на конформацию белковой молекулы. Но белки, в особенности глобулярные, характеризуются трехмерным расположением полипептидной цепи, за стабилизацию которого помимо обсуждавшихся водородных связей в основном ответственны нековалентные взаимодействия.

При той причине, что белки функционируют в водной среде, а вода обладает исключительно сильно выраженным деассоциирующим действием, образование белковых конформаций не может быть объяснено одним лишь большим числом водородных связей в спиральной и β -структурах. Помимо водородных связей решающий вклад в стабилизацию конформаций вносят ионные связи, вандерваальсовы дисперсионные силы и особенно гидрофобные взаимодействия. Под гидрофобными взаимодействиями понимают тот факт, что в водной среде гидрофобные группы плотно контактируют друг с другом с тем, чтобы уменьшить поверхность контакта с водой. Причина этого лежит в том, что соприкосновение гидрофобных групп с окружающими молекулами воды энергетически невыгодно. Об этом говорит то, что значение ΔH° слегка превышает нулевое. Рассмотрим окружение некоторого гидрофобного бокового радикала таким образом, что оно будет охарактеризовано определенным упорядоченным состоянием молекул воды. Если две гидрофобные группы вступают во взаимодействие, то умень-

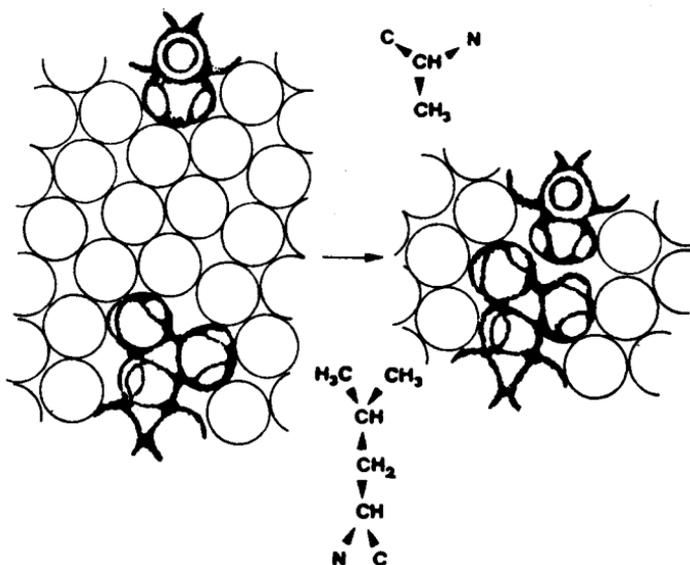


Рис. 3-16. Гидрофобные взаимодействия.

шается упорядоченность молекул воды (рис. 3-16). В соответствии с уравнением

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

результатом этого является прирост энтропии и, следовательно, появление отрицательной свободной энтальпии.

Фактором, благоприятствующим гидрофобным взаимодействиям, является изменение энтропии, точнее говоря, ее прирост. В случае глобулярных белков полярные и прежде всего почти все ионные группы находятся на поверхности, чем облегчается гидратация молекулы белка, имеющая большое значение для стабилизации пространственной структуры. У некоторых белков удаление воды неизбежно связано с их денатурацией. Большая часть неполярных остатков, напротив, находится внутри молекулы белка. Они укладываются плотно один к другому и практически выдавливают воду из первоначально еще непрочной клубковой структуры полипептидной цепи, что приводит к компактности и стабильности гидрофобного ядра. Само собой разумеется, что часть функциональных (ионных) групп боковых цепей находится внутри молекулы белка. Группы, оказавшиеся замаскированными, не подвергаются внешним воздействиям (изменение pH, реакции модификации и др.). Более того, измененная реакционная способность таких функциональных групп, имеющая значение для каталитического действия ферментов, определяется гидрофобным окружением и взаимодействием с

другими группами. В общем случае пространственная укладка полипептидной цепи глобулярных белков характеризуется относительно небольшой долей периодических структурных элементов (β -структура, α -спираль) и обнаруживает несимметричное и нерегулярное строение. В конечном счете причиной образования конформаций высокой стабильности является кооперативность между водородными и гидрофобными связями, а также другими нековалентными взаимодействиями, причем для биологически активных белков в физиологических условиях проявляются термодинамически стабильные конформации с минимальной свободной энергией.

Обобщая, остается сказать, что конформация остова белковой молекулы вносят решающую долю в формирование конформации глобулярного белка. Однако с помощью нековалентных взаимодействий (гидрофобные, диполь-дипольные взаимодействия, ионные связи, дисперсионные силы) осуществляется образование стабильной трехмерной структуры белка, имеющей исключительное значение для биологической функции глобулярного белка.

Следует указать также, что гидрофобные взаимодействия сами могут иметь значение для стабилизации определенной конформации (α -спираль, β -структура) остова молекулы белка.

3.6.2.2. Методы установления пространственной структуры белков

При рентгеноструктурном анализе белка неизвестной структуры регистрируется интерференционная картина от кристалла белка. Исходя из положения, числа и интенсивности рефлексов (максимумов интерференции) при определенных условиях, можно установить структуру рассеивающего кристалла [159, 160]. Вычисление распределения электронных плотностей осуществляется по формуле

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F(hkl) \cos 2\pi [hx + ky + lz - \alpha(hkl)]|$$

Вся установка для рентгеноструктурного анализа автоматизирована и связана с ЭВМ. Вычисляют распределение электронных плотностей $\rho(x, y, z)$ в элементарной ячейке. Каждый рефлекс характеризуется с помощью индексов Миллера h, k и l . V — объем элементарной ячейки, $F(h, k, l)$ — структурный фактор и $\alpha(h, k, l)$ — соответствующий фазовый угол. Последний должен быть определен косвенными методами, в то время как остальные величины вытекают из дифракционной картины.

Значения электронной плотности вычисляются по слоям, в которых точки равной плотности соединяют линиями. Таким образом, получают послойную диаграмму кристалла белка.

Установить структуры больших молекул белка стало возможным только при применении производных с тяжелыми атомами. Тяжелый атом, например атом рту-

ти, встраивается в поверхность молекулы. Это приводит к незначительным изменениям в структуре (изоморфное замещение), однако изменяет интенсивности рентгеновских рефлексов.

При применении нескольких производных с тяжелыми атомами на основе появляющихся изменений интенсивностей можно определить фазовый угол и затем рассчитать электронные плотности. Проведение такого структурного анализа кристаллов весьма трудоемко даже тогда, когда для сложных расчетов в распоряжении исследователя имеется высокопроизводительная вычислительная техника. Так, с кристалла белка и кристаллов различных изоморфных производных того же белка должно быть получено, измерено и скорректировано множество рефлексов. За этим следует установление положения тяжелых атомов и определение фазового угла для каждого рефлекса. Затем для нескольких десятков тысяч точек должны быть рассчитаны электронные плотности, и в заключение результаты должны быть интерпретированы.

Поскольку определение электронных плотностей с небольшим разрешением (0,5 нм) не столь трудоемко, обычно начинают исследование структуры кристалла белка с этого этапа. Тонкая структура, т. е. положение отдельных атомов, требует разрешающей способности 0,15 нм. Развитие этого метода, осуществленное в 1952 — 1960 гг. лабораториями Кендрию и Перутца, стало значительным научным достижением. Обзоры по установлению пространственной структуры белков написаны Хоппе [161], а также Джикерсоном и Гайсом [78]. К настоящему времени известны пространственные структуры более 50 белков.

Есть указания на принципиальную возможность анализа структуры кристалла белка с помощью электронного излучения, а также посредством метода *нейтронного рассеяния* [162]. В будущем, вероятно, приобретут значение математические методы, которые позволят осуществлять на ЭВМ расчет третичной структуры на основе данных о первичной структуре [163]. Первые попытки, в основном в применении к спиральным белкам (многоглобин), привели к интересным результатам [164]. Хеглер и Хониг [165] рассчитали на примере полипептидной цепи, составленной из глицина и аланина, условия, необходимые для образования компактной глобулярной структуры белка.

В случае аденилаткиназы данные, полученные из предсказания структуры белка, сопоставимы с данными рентгеноструктурного анализа. Совпадение выявилось в идентификации α -спиралей, а также в установлении контактов между тремя полипептидными цепями пятицепочечной β -структуры. Наиболее точно были определены точки «перелома» белковой цепи [166]. К другим стратегиям установления конформаций некристаллизующихся белков можно отнести кинетические исследования де- и ренатурации с целью локализации центров свертывания [167] и палеонтологические сопоставления, позволяющие выявить родственные связи между белками [168].

Для изучения конформации в физиологических условиях применяются различные спектроскопические методы. *ЯМР-спектроскопия* высокого разрешения, особенно в сочетании с КД-техникой, позволяет проводить на-

дежный анализ и интерпретировать сложные спектральные параметры. В противоположность упорядоченному состоянию в кристаллах в растворе наблюдается большое число конформаций.

Взаимодействие пептидов и белков с их окружением (гормон — рецептор, фермент — субстрат) приводит к конформационным изменениям участвующих молекул, которые можно проследить спектроскопически так же, как конформационные изменения, вызванные влиянием растворителей, комплексообразованием с ионами металлов или биологическими рецепторами.

Изменения конформации полипептидной цепи (α -спираль, β -структура, статистический клубок) могут быть также определены с помощью *инфракрасной спектроскопии*. Характерные полосы «амид I» и «амид II» изменяют положение максимума в зависимости от конформации. Измерение дихроизма в инфракрасной области с помощью плоскополяризованного излучения дает возможность однозначно различить α -спираль и β -структуру.

В УФ-области конформационные изменения белков лишь в незначительной степени влияют на абсорбцию, поэтому здесь наиболее достоверным методом является дифференциальная спектроскопия. Из сдвига спектра в коротко- или длинноволновую область, не связанного с изменениями интенсивности, могут быть получены данные о конформации белка в водном растворе.

Дисперсия оптического вращения (ДОВ) и круговой дихроизм (КД) изучались на большом числе белков [171, 172], но интерпретация этих данных относительно сложна.

Стремясь облегчить интерпретацию, пробуют установить связь между эффектом Коттона и данными рентгеноструктурного анализа. Этим методом было, например, показано высокое содержание α -спиралей в миоглобине и немного меньшее (с участками β -структуры) в лизоциме, карбоксипептидазе А и папаине, в то время как в рибонуклеазе и химотрипсине α -спиральность оказалась очень низкой. Хорошая корреляция рентгеноструктурных данных и результатов ДОВ и КД была получена на миоглобине и лизоциме, т. е. на белках с высокой спиральностью, но не удалась на химотрипсине.

Очевидно, в неспиральных белках на эффект Коттона сильно влияют другие элементы пространственной структуры, например асимметрия, присущая дисульфидным связям или ароматическим остаткам в окружении асимметричных центров, что приводит к более или менее сильным искажениям. Кроме того, проявляемый эффект в случае β -структуры намного ниже, чем в случае α -спирали. Ситуация усложняется еще тем, что и другие структуры обуславливают эффект Коттона подобно α -спиралям.

Несмотря на эти ограничения, хироптические методы получили большое значение при конформационном анализе белков. Результативным является прямое сравнение данных, полученных на нативных и денатурированных белках, а также распространение исследований на химически модифицированные белки.

Метод *водородно-дейтериевого обмена* позволяет определить в белке число и вид водородных связей. Метод основан на том, что атом водорода

да, связанный со свободной электронной парой другого атома, может в виде протона очень быстро обмениваться с протонами растворителя. Атомы водорода, связанные с атомами углерода, в обмене участия не принимают. На этой основе выработаны различные экспериментальные варианты метода.

Например, за обменом протонов пептидных связей можно наблюдать непосредственно, следя за исчезновением полосы деформационных колебаний N — H при 1550 см^{-1} . В то же время при длительной обработке тяжелой водой (D_2O) все замещаемые атомы водорода обмениваются на дейтерий. Затем в воде посредством ИК-спектроскопии или измерения плотности снимается кинетика замещения дейтерия. Однозначность получаемых результатов ограничена даже при том условии, что применяются очень чистые белки.

В заключении можно констатировать, что как приведенные здесь, так и другие методы исследования конформаций полипептидов и белков в растворе по отдельности дают информацию лишь о некоторых аспектах структуры белка, однако совместное применение различных методов ведет к получению более надежных результатов.

3.6.3. Четвертичная структура [173 — 174]

Под четвертичной структурой понимают построение олигомерного белка из определенного комплекса нескольких полипептидных цепей. Ассоциация двух или нескольких полипептидных цепей происходит под действием межмолекулярных взаимодействий между полярными, ионизируемыми и неполярными боковыми группами посредством диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий и образования ионных пар. В исключительных случаях четвертичная структура также стабилизируется дисульфидными мостиками.

Все четвертичные структуры характеризуются как стехиометрическим составом, так и геометрией строения. Наименьшая, как правило связанная нековалентно, часть белка, имеющего четвертичную структуру, называется *субъединицей*.

Четвертичная структура может быть как гомогенной, так и гетерогенной. В первом случае в функциональную структуру ассоциированы только идентичные полипептидные цепи, в то время как элементами белков с гетерогенной четвертичной структурой являются неидентичные цепи. Оказалось, что у глобулярных белков с $M > 50\,000$ всегда доминирует четвертичная структура. До 1974 г. было известно приблизительно 650 белков с четвертичной структурой, из них ~ 500 ферментов. Принцип образования четвертичной структуры имеет важное значение для функции белка. Например, становятся возможными кооперативные реакции, имеющие значение для регуляторных процессов в клетке.

Регуляторные ферменты, в отличие от нерегуляторных одноцепочечных, состоят в основном из субъединиц.

Таблица 3-8. Молекулярные массы и состав некоторых белков, имеющих четвертичную структуру

Белок	Источник	M	Субъединицы	
			Число	M
Гемоглобин	Кровь млекопитающих	64 250	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 15 130 β : 15 870
Вирус табачной мозаики	Инфицированные листья	39 400 000	2130	17 530
Конканавалин А	<i>Canavalia ensiformis</i>	55 000	2 ^a	27 000
Лактоглобулин		36 750	2 ^a	18 375
Энтеротоксин	Холерные вибрионы	84 000	6 ^a	14 000
Церулоплазмин	Плазма	125 000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 16 000 β : 53 000
Нервный ростовой фактор	Мышь	26 520	2 ^a	13 260
Репрессор лактозы	<i>E. coli</i>	150 000	4 ^a	39 000
Каталаза	Печень теленка	240 000	4 ^a	60 000
Алкогольдегидрогеназа	Дрожжи	141 000	4 ^a	35 000
Люцифераза	<i>Renilla</i>	34 000	3 ^a	12 000
Малатдегидрогеназа	Нейроспора	54 000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	13 500
Аспаргаткиназа	<i>Bac. polymyxa</i>	116 000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 17 000 β : 43 000
Лейцинаминопептидаза	Хрусталик глаза, почки свиньи	530 000 255 000	6 ^a 4 ^a	58 000 63 500
Глутаминсинтетаза	Мозг свиньи, почки свиньи	370 000 370 000	8 ^a 4 ^a	46 000 90 000
Фосфофруктокиназа	Дрожжи	770 000	6 ^a	130 000
Аргининдекарбоксилаза	<i>E. coli</i>	850 000	10 ^a	82 000

^a Идентичные субъединицы.

Построение из субъединиц дает, наконец, значительную экономию генетического материала.

Принципы организации олигомерных ферментов рассмотрены в обзоре [175].

Установление четвертичной структуры возможно непосредственно с помощью электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. В то

же время известны различные методы диссоциации олигомерного белка на субъединицы для последующего их изучения. Диссоциация возможна при обработке 1%-ным додецилсульфатом натрия, 6 М гуанидингидрохлоридом и 8 М мочевиной. Часто уже достаточно изменения ионной силы, pH, концентрации белка, температуры, добавления или удаления кофактора или других химических модификаций.

Большое значение при доказательстве и определении молекулярной массы субъединиц имеют ультрацентрифугирование, ДСН-электрофорез в полиакриламиде, гель-фильтрация и другие уже рассмотренные ранее методы (разд. 3.5.4). В этой связи надо упомянуть, что в условиях диссоциации не только регуляторные, но и каталитические функции ферментов сильно повреждаются или совершенно теряются.

В табл. 3-8 приведены примеры белков, имеющих четвертичную структуру.

3.7. Биосинтез белков [176 — 179]

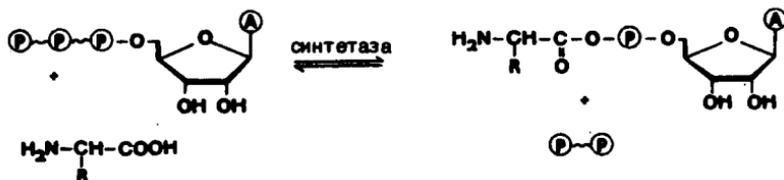
Несмотря на то что существует еще много неясных вопросов, в выяснении механизма биосинтеза белка в последние годы достигнуты значительные успехи. Различают в основном три основные стадии процесса:

- 1) активации аминокислот и их связывание с тРНК;
- 2) образование полипептидной цепи на рибосоме;
- 3) отделение готового белка от рибосомы.

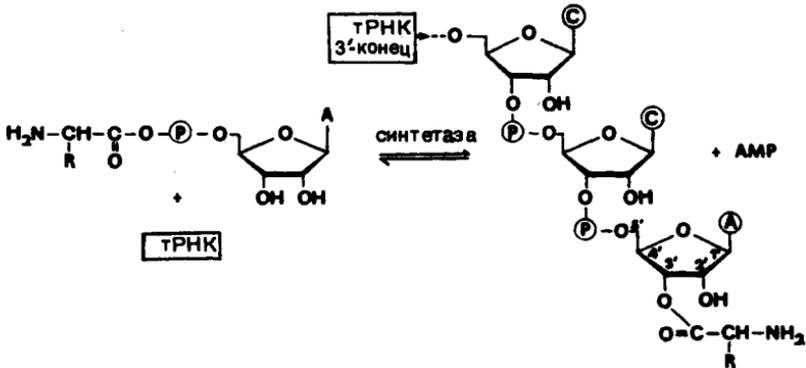
Для протекания каждой стадии процесса необходимы специфические ферменты и кофакторы.

3.7.1. Активация аминокислот и их связывание с тРНК

Активация карбоксильных групп аминокислот осуществляется в цитоплазме под действием специфических аминоацил-тРНК-синтетаз при участии аденозинтрифосфата и Mg^{2+} . Сначала при элиминировании пирогосфата образуется смешанный ангидрид аминокислоты и фосфатного остатка адениловой кислоты, который существует только в виде комплекса с ферментом.



На последующей стадии реакции активированная аминокислотная группа переносится на тРНК, причем действует та же синтетаза и при отщеплении аденозинмонофосфата образуется сложноеэфирная связь с рибозой 3'-концевого аденозина тРНК:



Для каждой из 20 аминокислот имеется особая тРНК и особая аминокислот-тРНК-синтетаза. Структуры ряда синтетаз известны. Их молекулярные массы соответствуют интервалу 46 000 — 140 000 для одно- и двухцепочечных ферментов и 220 000 — 290 000 для четырехцепочечных $\alpha_2\beta_2$ -типа. Они построены из субъединиц симметрично, но в противоположность другим глобулярным белкам — ферментам — обладают менее компактной структурой. Места связывания аминокислоты и тРНК могут быть локализованы на различных субъединицах.

Димерный белок *тирозил-тРНК-синтетаза*, для которой сделан рентгеноструктурный анализ с разрешением 0,27 нм, характеризуется M 90 000 и размером молекулы 13 нм. Узнавание ферментом нужной аминокислоты и тРНК происходит с исключительной точностью. Комплекс фермент — аминокислота образуется путем электростатического взаимодействия с элементами белковой структуры, а также за счет полярных и гидрофобных связей с боковой цепью аминокислоты. Условием для образования комплекса является наличие правильной конфигурации аминокислоты.

Транспортная РНК, функционирующая в качестве переносчика аминокислоты, состоит из 73 — 93 нуклеотидных остатков и соответственно $M \approx 25$ 000. В состав тРНК помимо обычных нуклеиновых оснований (А, U, G, С) входит ряд редких оснований, часть из которых образуется путем метилирования обычных. Редкие элементы структуры могут препятствовать спариванию оснований в неспариваемых областях петель и защищать молекулу от гидролитического разрушения нуклеазами.

Известны нуклеотидные последовательности более чем 120 тРНК. Они имеют похожие вторичные структуры, условно названные структурами клеверного листа.

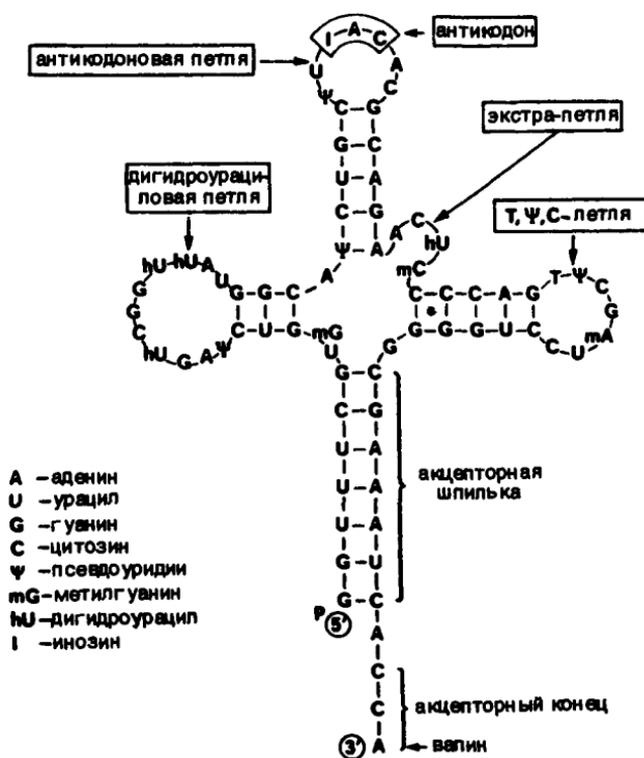


Рис. 3-17. Вторичная структура тРНК^{Val} из дрожжей (структура клеверного листа).

Все тРНК имеют аминоксил-акцепторную «шпильку» (7 пар оснований), заканчивающуюся общей для всех аминокислот последовательностью -С-С-А, дигидроурациловую «шпильку» (3 — 4 пары оснований), антикодонавую «шпильку» (5 пар оснований) и TΨC-«шпильку» с 4 — 5 парами оснований (рис. 3-17).

Петли, находящиеся на шпильках, символизируют структуру клеверного листа; шпильки и петли образуют в каждом отдельном случае своеобразную «руку». Антикодонавая и TΨC-петля состоит из 7 оснований каждая, дигидроурациловая из 7 — 10 и экстра-петля из 4 — 21 основания; последняя образует переменную «руку».

Рентгеноструктурным анализом была определена третичная структура фенилаланиновой тРНК из дрожжей [182, 183]. Согласно этим данным, молекула имеет форму буквы L. Угол буквы образован дигидроурациловой, TΨC- и переменной «руками». Все области шпилек имеют структуру двойных спиралей.

На рис. 3-18 рибозофосфатная цепь показана как сплошная полоса. Можно увидеть заштрихованные «руки» тРНК и водородные мостики между парами оснований. В фермент-субстратном комплексе внутренняя часть L и поверхность фермента находятся в тесном контакте (пунктирная линия).

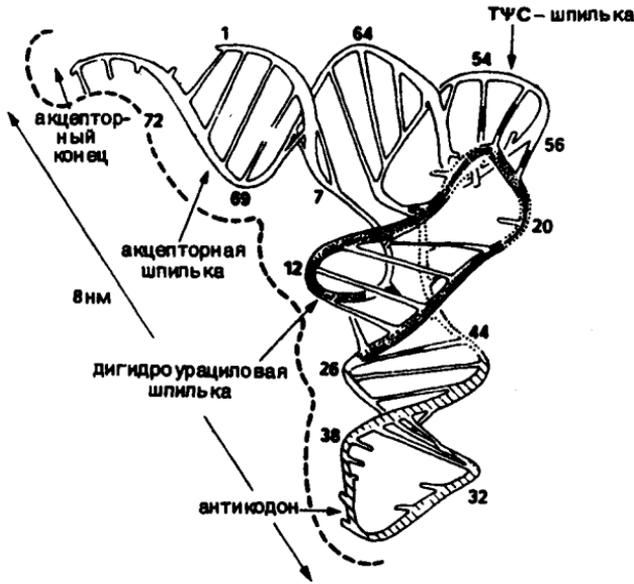


Рис. 3-18. Третичная структура тРНК^{Phe} из дрожжей.

Если тРНК этерифицируется какой-либо «неправильной» аминокислотой, тогда такая сложноэфирная связь снова расщепляется необычно быстро работающим корректирующим механизмом [186, 187]. Гидролиз сложноэфирной связи («неправильных» эфиров), катализируемый синтетазой, протекает еще до диссоциации комплекса фермент — тРНК. Об этапах активации аминокислот при биосинтезе белка сообщает Хаар [188].

3.7.2. Образование полипептидной цепи на рибосоме

Информация, необходимая для построения определенной аминокислотной последовательности, содержится в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Молекула ДНК является полинуклеотидом, образованным основаниями аденином (А), гуанином (G), цитозином (С), тиминном (Т), остатками фосфорной кислоты и 2-деоксирибозой в качестве углеводного компонента. Все ДНК построены как регулярные двойные спирали, структура которых стабилизирована водородными связями между комплементарными парами оснований А — Т и G — С. В ДНК каждые три следующих один за другим нуклеотида (триплетный код) кодируют одну аминокислоту [189 — 192]. Для 20 протеиногенных аминокислот существуют 64 кодовые единицы (кодона), из которых по 6 приходится на аминокислоты Leu,

Таблица 3-9. Генетический код

1-е основание	2-е основание				3-е основание
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	term	term	A
	Leu	Ser	term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Arg, Ser, по 4 — на Pro, Thr, Val, Ala и Gly, 3 — на Ile, 2 — на Phe, Tyr, Cys, His, Gln, Asn, Glu, Asp, Lys и по одной приходится на Met и Trp.

Содержащиеся в генетическом коде триплеты UAG, UAA и UGA не кодируют какую-либо аминокислоту, а определяют конец цепи. Ранее они были названы «бессмысленными» (nonsense) кодами.

Для начала биосинтеза белка информация, содержащаяся в ДНК, должна быть прежде всего перенесена к рибосоме. Это осуществляется через матричную (информационную) РНК (мРНК), представляющую собой одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту, содержащую рибозу на месте дезоксирибозы и урацил на месте тимина. Построение мРНК осуществляется по принципу идентичной репликации на локально расплетенном участке ДНК (рис. 3-19) и называется транскрипцией.

Помимо модели Уотсона — Крика процесс репликации может быть объяснен моделью Родлея («side-by-side»-модель, SBS-модель). Процесс начинается с параллельной укладки цепей ДНК. Нити, связанные друг с другом водородными связями комплементарных оснований, принимают форму волнистой ленты. Каждая цепь образует сначала на длине полупериода повторяемости (10 оснований) правовращающую спираль, затем переламывается и далее идет обратно как левовращающая спираль. Характерные свойства (спаривание и укладка оснований, период повторяемости) остаются в модели SBS. Модель, ставящая под сомнение уникальность модели Уотсона — Крика, помимо прочего, лучше интерпретирует репликацию

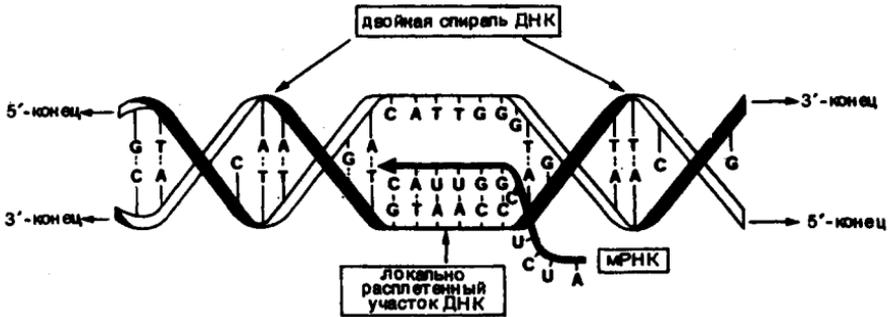


Рис. 3-19. Ферментативный синтез мРНК на матрице ДНК (асимметричная транскрипция ДНК).

длинных цепей ДНК, а также бактериальных кольцевых ДНК. Последние конформационные исследования на двухцепочечных ДНК допускают возможность переходов между двойной спиралью и расплетенной структурой.

Расплетенная переходная конформация названа *цис*-лестничной. В ней сахарофосфатные цепи находятся в *цис*-положении по отношению к парам оснований, которые в свою очередь располагаются как ступеньки лестницы. Нити ДНК могут без разрыва переходить из *цис*-лестничной конформации в другие, и наоборот.

При транскрипции генетическая информация одного или нескольких генов (участков ДНК) копируется и переносится на мРНК. Молекула мРНК затем идет в цитоплазму, связывается с рибосомой и образует матрицу для синтеза полипептидной цепи. С молекулой мРНК связано множество рибосом, образующих подобие ожерелья. Образуется структура, называемая полирибосомой и полисомой.

Рибосомы сами по себе являются рибонуклеопротеинами с содержанием нуклеиновых кислот ~60%. Они находятся в свободном состоянии прежде всего в цитоплазме и в связанном — в эндоплазматическом ретикулуме. Все рибосомы состоят из двух субъединиц, на которые они диссоциируют в зависимости от концентрации Mg^{2+} . У наиболее хорошо изученных рибосом *E. coli* большая (50 S) субъединица включает 5 S- и 23 S-рибосомные РНК, а также 34 различных белка; малая (30 S) субъединица состоит из 16 S-рибосомной РНК и 21 белка. Рибосомы эукариот образованы 60 S- и 40 S-субъединицами.

На рис. 3-20 схематически показаны в рибосоме *E. coli* главные места связывания аминоацил- и пептидил-тРНК, расположенные на большой субъединице. Молекула мРНК движется в «желобе» между субъединицами.

На следующей ступени биосинтеза белка нуклеотидная последовательность мРНК переводится на язык аминокислотной последовательности. Этот процесс, получивший название «трансляции» [193], начинается со связывания мРНК и иницирующей аминоацил-тРНК с 30 S-субъединицей рибосомы (инициация).

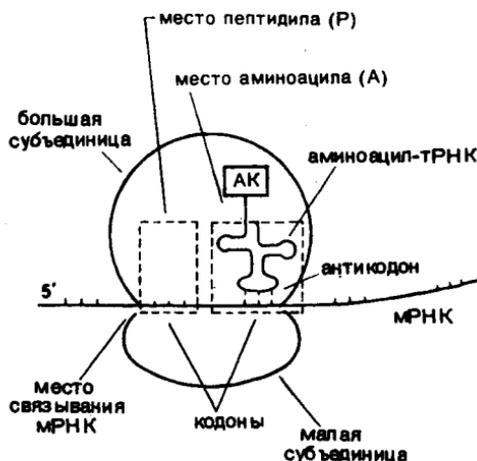


Рис. 3-20. Схема структуры рибосомы *E. coli* с местами связывания аминоквила и пептидила (по Ленинджеру).

В прокариотах, а также, вероятно, во всех остальных организмах в роли иницирующей аминокислоты выступает метионин, кодируемый кодоном AUG [194]. Соответствующая метионил-тРНК перед началом процесса ферментативным трансформированием переводится в формилметионил-тРНК.

В сложном начальном процессе принимают участие три белковых фактора инициации IF_1 , IF_2 и IF_3 . Сначала мРНК ассоциируется с комплексом IF_3 — 30 S-субъединица, затем при участии IF_2 и GTP идет присоединение формилметионил-тРНК. Образовавшийся иницирующий комплекс вместе с большой субъединицей формирует готовый к синтезу белка 70 S-рибосомный комплекс.

В процессе удлинения цепи (элонгация) новая аминоквиц-тРНК присоединяется к активному 70 S-рибосомному комплексу. Своей антикодоновой петлей она входит во взаимодействие с соответствующим кодоном мРНК (образование водородных связей), причем правильное положение аминоквиц-тРНК на аминоквицсвязывающем месте (А-место) обеспечивает фактор элонгации Tu ($EF - Tu$). Процесс обеспечивается предварительным специфическим связыванием молекулы аминоквиц-тРНК с комплексом GTP с $EF - Tu$ и последующим гидролизом GTP до GDP и неорганического фосфата.

Замыкание первой пептидной связи идет через нуклеофильную атаку аминогруппой аминоквиц-тРНК сложноэфирной группы соседней формилметионил-тРНК и катализируется пептидилтрансферазой, относящейся к большой субъединице. Для подготовки к присоединению следующей аминокислоты пептидил-тРНК, еще связанная на А-месте, должна пе-

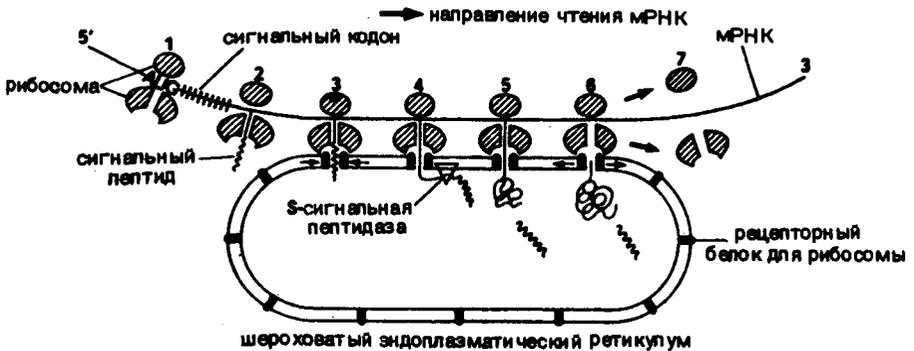


Рис. 3-22. Сигнальная гипотеза — схема протекания процесса биосинтеза секреторных белков.

эфирной связи между С-концевой карбоксильной группой пептида и гидроксильной группой остатка рибозы. Одновременно освобождаются последняя тРНК и мРНК, рибосома диссоциирует на субъединицы, и может начинаться новый цикл синтеза белка. Сегодня считается достоверным, что синтезированные полипептидные цепи покидают рибосому в биологически активной форме. Об этом, помимо прочего, говорят ферментативные активности, которые могут быть показаны на последней фазе синтеза белка на рибосоме. Формильная группа и не требующийся более метионин отщепляются ферментативно. Непосредственно после отщепления происходит замыкание дисульфидных мостиков и другие ковалентные модификации, например гидроксирование, метилирование или фосфорилирование. Биосинтез покидающих клетку секреторных белков протекает на мембране эндоплазматического ретикулума. По «сигнальной» гипотезе [195, 196] информация об особом пути и месте синтеза содержится в так называемых «сигнальных» кодонах мРНК, следующих непосредственно за стартовым кодоном AUG и кодирующих последовательность сигнального пептида.

Сигнальный пептид, состоящий обычно из 15 — 20 гидрофобных аминокислот, вступает через рибосомный рецепторный белок во взаимодействие с эндоплазматическим ретикулумом и начинает локально-специфический синтез белка. Еще до завершения синтеза он отщепляется «сигнальной пептидазой» от остальной цепи. Полипептидная цепь секреторного белка выводится через систему каналов эндоплазматического ретикулума и вслед за этим сворачивается в нативную конформацию.

Сравнение сигнальных последовательностей белков, продуцируемых одной железой, показывает поразительное сходство. Так, сигнальные последовательности панкреатических ферментов трипсина и химотрипсина различаются лишь в положении 6:

Ala-Lys-Leu-Phe-Leu-Phe-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ala-Tyr-Val-Ala-Phe

(Leu)

В последние годы было проведено направленное выделение и установление структуры ряда препробелков: препроинсулина [197], препропаратиреоидного гормона [198], препролактинина [199] и др. Таким образом, «сигнальная» гипотеза существенно способствовала пониманию тонких механизмов биосинтеза белка.

3.7.4. Регуляция биосинтеза белка [200]

Регуляция биосинтеза белка, протекающего с исключительно высокой (до 100 пептидных связей в секунду!) скоростью и точностью, осуществляется на уровнях транскрипции и трансляции. Механизм экспрессии гена был выяснен Жакобом и Моно [201] на примере лактозной системы *E. coli*. Являясь источником углерода для *E. coli*, лактоза действует как индуктор для синтеза трех ферментов — пермеазы, β -галактозидазы и трансацетилазы, делающих возможным использование необычных питательных веществ. Информация, необходимая для биосинтеза ферментов, содержится в трех структурных генах, которые вместе с ответственным за транскрипцию операторным геном образуют единый комплекс — оперон. Индуктор действует через ранее включенный регуляторный ген на операторный ген. В отсутствие лактозы репрессор (аллостерический белок) вступает во взаимодействие с регуляторным геном и таким образом блокированием всего оперона прекращает синтез ферментов.

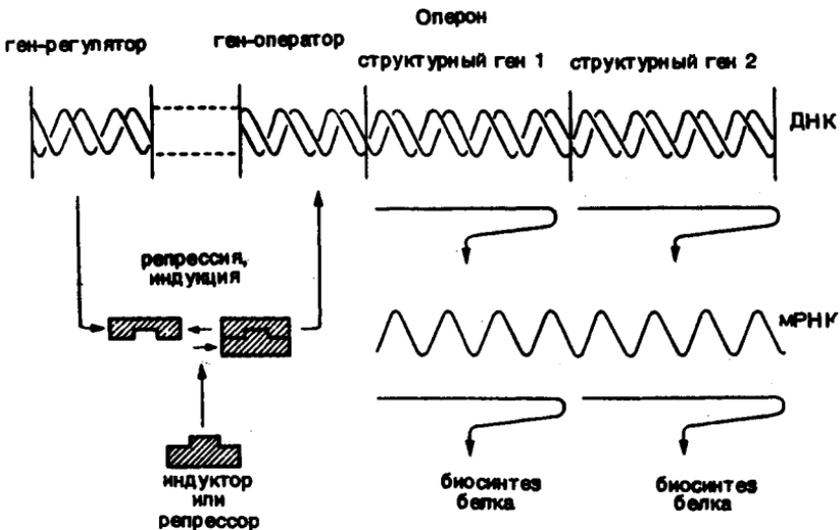


Рис. 3-23. Регуляция процесса биосинтеза белков [3].

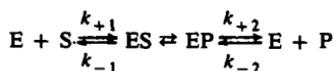
На специфическом подавлении отдельных стадий биосинтеза белка основано действие ряда антибиотиков (разд. 2.3.5). Так, актиномицин интеркалирует и рифамицин селективным подавлением РНК-полимеразы нарушают процесс транскрипции. Хлорамфеникол нарушает трансляцию, блокируя реакцию переноса пептидила в рибосоме. Стрептомицин ассоциирует с 30 S-субъединицей рибосомы и ведет к ошибкам в переносе, а очень похожий на аминокислотный конец тРНК пурамицин вызывает преждевременный обрыв синтезируемой цепи.

3.8. Избранные примеры функциональных белков

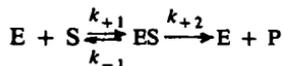
3.8.1. Ферменты [202 — 211]

Ферментами называются простые или сложные, состоящие из нескольких субъединиц белки, которые, будучи высокоспецифичными биокатализаторами, ускоряют наступление равновесия химической реакции вне или внутри клетки, снижая энергию активации соответствующей реакции. Многие ферменты для осуществления каталитического действия помимо белкового компонента нуждаются в кофакторе, например ионе металла (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), и/или коферменте (простетическая группа). Коферменты действуют как переносчики электронов и функциональных групп: атомов водорода, ацетильных, метильных и аминогрупп. Они часто идентичны с витаминами — необходимой составной частью пищи высших организмов.

Ферментативный катализ характерен образованием фермент-субстратного комплекса (ES), который переходит в комплекс фермент — продукт (EP) и затем диссоциирует на фермент и продукт:



В оптимальных условиях, т. е. при определенных температуре и pH, образование комплекса фермент — продукт происходит спонтанно, и этим процессом, как и обратной реакцией, можно пренебречь:



Существование фермент-субстратного комплекса было надежно установлено экспериментально. При данном количестве фермента повышение концентрации субстрата ведет к увеличению скорости реакции, максимум которой достигается при насыщении фермента субстратом.

Количественную взаимосвязь между скоростью реакции и концентрацией субстрата описывает уравнение Михаэлиса — Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{\max} S}{K_M + S}$$

где V_0 — начальная скорость, V_{\max} — максимальная скорость, S — концентрация субстрата, K_M — константа Михаэлиса.

Константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой скорость равна половине максимальной. K_M и V_{\max} можно найти графически, используя выражение, обратное уравнению Михаэлиса — Ментен и называемое уравнением Лайнуивера — Берка

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Для построения графика используют координаты $1/V_0$ и $1/S$.

У *аллостерических ферментов*, состоящих из нескольких субъединиц [213 — 215], кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата имеет характерный сигмоидный вид. Такой фермент независимо от наличия субстрата имеет две различные конформации, находящиеся в равновесии. Активность этого фермента контролируется *аллостерическими эффекторами* (обычно несложными органическими веществами). Связывание эффектора происходит на одной из субъединиц в аллостерическом центре, пространственно отделенном от места связывания субстрата, и вызывает конформационные изменения других субъединиц. Фермент активируется, если эффектор является *активатором*, и ингибируется, если с аллостерическим центром связывается *ингибитор*. Аллостерические ферменты обычно участвуют в контроле первых ступеней мультиферментных цепей.

Различают конкурентные и неконкурентные ингибиторы ферментов. *Конкурентные ингибиторы* структурно подобны субстрату и занимают его место в субстратсвязывающем центре. Избытком субстрата они могут быть снова удалены. *Неконкурентные ингибиторы* реагируют с другими важными структурными частями фермента, например с группой SH, и не могут быть удалены избытком субстрата.

В качестве международной единицы ферментативной активности принят *катал*; 1 кат равен ферментативной активности, обуславливающей превращение 1 моль субстрата в 1 с.

По специфичности действия ферменты разделяют на 6 основных классов, которые в свою очередь подразделяются на подклассы и подгруппы.

В настоящее время известно около 2000 ферментов, из которых десятая часть получена в кристаллическом состоянии. Общие принципы их высокоспецифичного каталитического действия известны, но, однако, многие вопросы молекулярного механизма действия, тонкой регуляции и генетического контроля еще неясны.

В последние годы использование ферментов для технологических процессов превращения веществ, например в химической и фармацевтической промышленности, приобрело большое значение. При этом прежде всего

Таблица 3-10. Классификация ферментов по специфичности действия

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
1. Оксидоредуктазы	Реакции окисления и восстановления	
Дегидрогеназы (с NAD^{\oplus} или NADP^{\oplus})		Лактат-, алкоголь-, малат-, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы
Оксидазы (с кислородом в качестве акцептора)		Глюкозо- и моноаминоксидаза, оксидазы аминолот
Гидроксилазы (обеспечивают встраивание кислорода)		Фенилаланин-4-гидроксилаза, стероид-II- β -гидроксилаза
2. Трансферазы	Перенос групп	
C_1 -Трансферазы		Метил-, гидроксиметил-, карбомилтрансферазы
Альдегидо- и кето-трансферазы		Трансальдолаза, транскетолаза
Ацилтрансфераза		Ацетилтрансферазы, тиолаза
Аминотрансферазы		Все трансминазы
Фосфотрансферазы		Гексо-, глюко-, фосфофруктокиназы, РНК-полимеразы, РНКазы
3. Гидролазы	Гидролитическое расщепление связей	
Эстеразы	Расщепление сложных эфиров	Ацетилхолинэстераза, липазы
Гликозидазы	Расщепление гликозидов	α -Гликозидазы (α -амилаза, глюкоамилаза), β -гликозидазы (целлюлазы, β -глюкуронидаза), нуклеозидазы
Экзопептидазы	Расщепление пептидной связи	Дипептидилпептидазы, аминок- и карбоксипептидазы
Эндопептидазы		Трипсин, химотрипсин
Амидазы	Расщепление амидных связей	Аспарагиназа, глутаминаза, уреазы, аргиназа
	Расщепление ангидридных связей кислот	АТРазы, пирофосфатаза
4. Лиазы	Элиминирование и присоединение по двойной связи	
C-C-Лиазы		Декарбоксилазы аминокислот, пируватдекарбоксилаза, альдолазы

Продолжение табл. 3.10

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
C-O-Лиазы		Аконитаза, карбоангидраза
C-N-Лиазы		Енолаза, фумараза, аспартаза
5. <i>Изомеразы</i> Рацемазы	Изомеризация	Пролинрацемаза, рацемазы других аминокислот
Эпимеразы		Рибулозофосфат-3-эпимераза
<i>цис-транс</i> -Изомераза		Изомераза малеилацетоуксусной кислоты
6. <i>Лигазы (синтетазы)</i>	Соединение двух молекул субстрата с участием АТФ	
C-O-Лигазы		Все тРНК-синтетазы
C-N-Лигазы		аминокислот Аспарагин-, глутамин-, глутатионсинтетазы
C-C-Лигазы		Пируваткарбоксилаза
C-S-Лигазы		Ацетил- и сукцинат- CoA-синтетазы

используются *иммобилизованные ферменты*, что имеет следующие преимущества: возможность повторного применения, непрерывное проведение процесса при низких температурах и легкую отделяемость продукта. Имобилизацию осуществляют за счет *адсорбции на носителе* (синтетические или природные полимеры, стекло, активированный уголь), *включением в носитель* (микрокапсулирование), *ковалентным связыванием с носителем* через подходящую функциональную группу и *ковалентной сшивкой* молекул фермента би- или полифункциональными реагентами (например, при обработке диальдегидами, диаминами, производными дикарбоновых кислот и др.). В процессе иммобилизации биологическая активность фермента должна максимально сохраняться.

Далее будут более детально описаны структура и действие некоторых наиболее важных ферментов.

3.8.1.1. Рибонуклеаза [216]

Рибонуклеаза А из поджелудочной железы теленка состоит из одной полипептидной цепи, включающей 124 аминокислотных остатка и сшитой четырьмя дисульфидными мостиками. Фермент относится к фосфодиэстера-

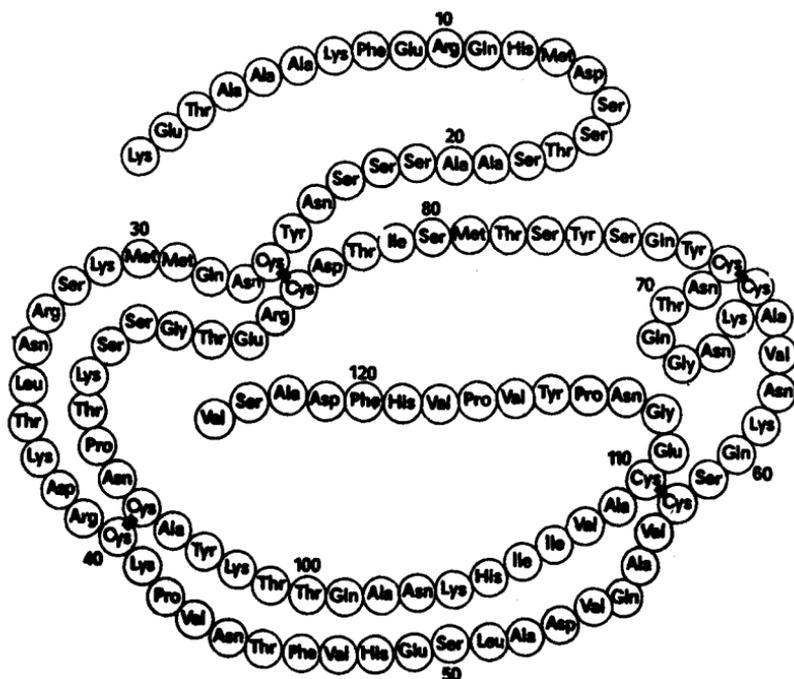


Рис. 3-24. Первичная структура рибонуклеазы А из поджелудочной железы теленка [217].

зам и катализирует гидролитическое расщепление молекулы РНК по фосфоэфирной связи между пиримидин-3'-фосфатом и 5'-гидроксигруппой соседнего остатка рибозы. Продуктами гидролиза являются 3'-рибонуклеозидмонофосфаты и олигонуклеотиды, имеющие на конце остаток пиримидин-3'-фосфата.

Фермент выделен Дюбо. В 1940 г. Кунитц смог получить его в кристаллической форме, а в 1963 г. Смит, Штейн и Мур опубликовали полную первичную структуру. Третичная структура была установлена Карлиселе с сотр. (рентгеноструктурный анализ с разрешением 0,55 нм), а также в лаборатории Карты [218].

Рибонуклеаза по модели, описанной Картой и полученной с разрешением 0,2 нм в результате синтеза Фурые для семи различных производных с тяжелыми атомами (7294 измерения), представляет собой молекулу почкообразной формы размером $3,8 \times 2,8 \times 2,2$ нм. Активный центр фермента находится в «почечной борозде» — характерной щели, разделяющей молекулу на две половины и содержащей ответственные за каталитическую активность остатки гистидина (положения 12 и 119) и лизина (положения 41 и 7).

При восстановлении меркаптоэтанолом в 8 М растворе мочевины молекула рибонуклеазы разворачивается в биологически неактивную неупорядо-

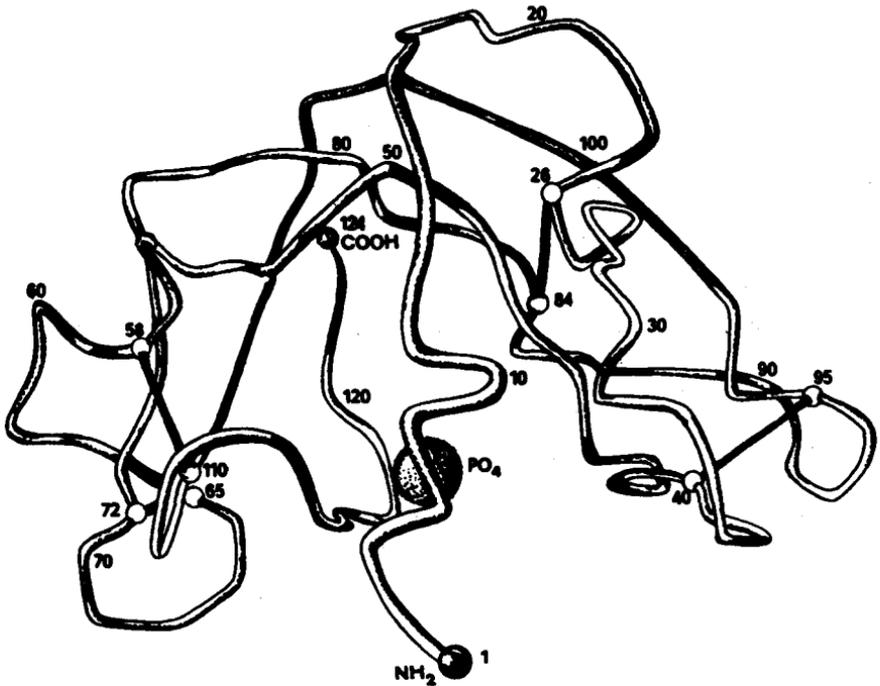


Рис. 3-25. Модель пространственной структуры рибонуклеазы А [218].

ченную структуру. Большое значение имело открытие, что при реокислении восстанавливается нативная конформация и вместе с этим полная биологическая активность фермента. Из 105 возможных вариантов замыкания дисульфидных связей при ренатурации реализуется только один, т. е. пространственная структура белка предопределена его аминокислотной последовательностью.

По данным Рихардса [219], рибонуклеаза А при обработке бактериальной протеазой субтилизином расщепляется между остатками Ala-20 и Ser-21 на так называемый *S-пептид* (1 — 20) и *S-белок* с последовательностью 21 — 124, содержащий 4 дисульфидных мостика. Оба компонента после разделения показывают ничтожную биологическую активность. Однако, если смешать их один с другим, биологическая активность восстанавливается, т. е. *S-пептид* и *S-белок* с помощью невалентных связей «собираются» в так называемую *рибонуклеазу S*, обладающую пространственной структурой, близкой к нативной конформации.

Для рибонуклеазы *S* пространственная структура определена с разрешением 0,35 нм [220, 221]. Результаты совпадают с моделью Карты. Найдено, что около половины *S-пептида* находится в виде α -спирали. Вся молекула содержит ~15% спиральной и ~75% β -структуры.

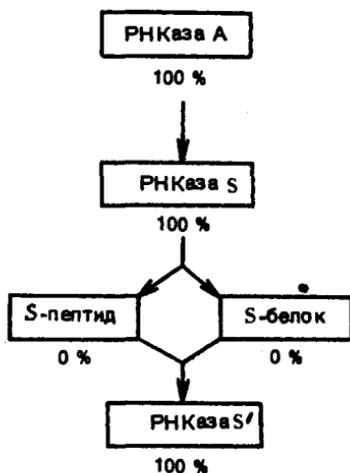


Рис. 3-26. Схема ферментативного расщепления рибонуклеазы А и рекомбинации продуктов расщепления.

По данным Скофоне и сотр. [222], синтезировавших большое число аналогов S-пептида, он, будучи один, образует *статистический клубок*. Спиральная конформация возникает лишь после соединения с S-белком. Для связывания S-пептида и S-белка существен остаток фенилаланина в положении 8. Для полного достижения биологической активности достаточно участка 1 — 14 S-пептида.

Рибонуклеаза была первым ферментом, который удалось получить полным химическим синтезом. Гутт и Меррифилд синтезировали цепь с С-конца на твердой фазе с использованием автоматического синтезатора (разд. 2.2.7.1). Концепция группы Мерка (разд. 2.2.5.3) состояла в построении фрагментной конденсацией S-белка и соединении его с синтетическим S-пептидом. Невысокая (20 — 30%) величина полученной биологической активности объясняется неоднородностью конечного продукта синтеза.

В поджелудочной тельца помимо рибонуклеазы А присутствуют рибонуклеазы В, С и D. Эти ферменты относятся к гликопротеинам и имеют различное содержание углеводов. Например, рибонуклеаза В соединена через остаток аспарагина в положении 34 с пятью остатками маннозы и двумя остатками глюкозы. Для ряда рибонуклеаз, найденных в грибах и бактериях, определена структура, описан синтез *рибонуклеазы T₁*, состоящей из 104 аминокислотных остатков.

3.8.1.2. Лизоцим

Лизоцим — бактериолитическая гидролаза, широко распространенная в бактериях, растениях, позвоночных и беспозвоночных. Фермент катализи-

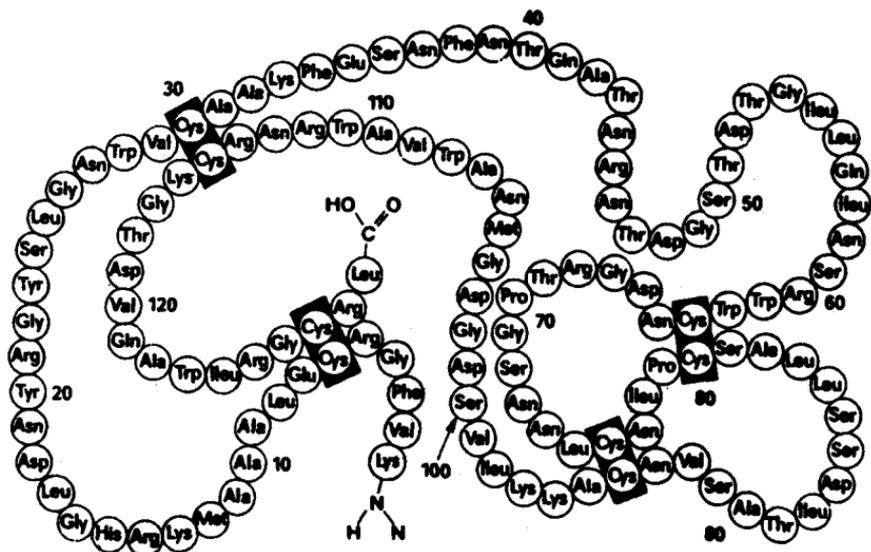


Рис. 3-27. Первичная структура лизоцима из куриного яйца [223].

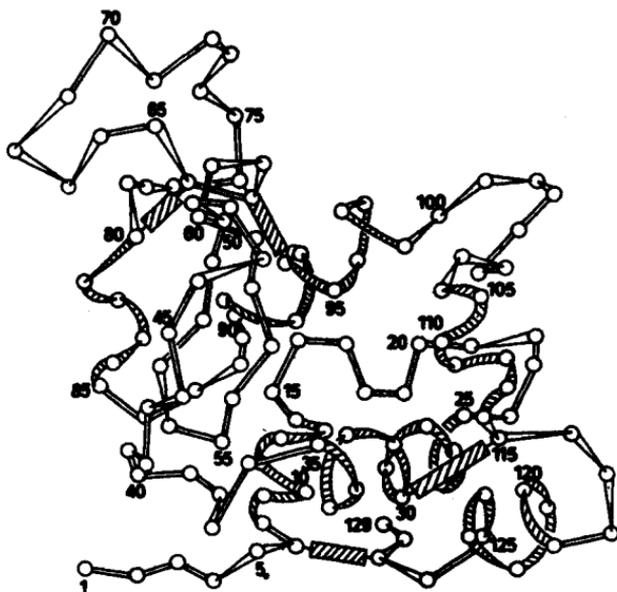


Рис. 3-28. Модель пространственной структуры лизоцима из куриного яйца [224].

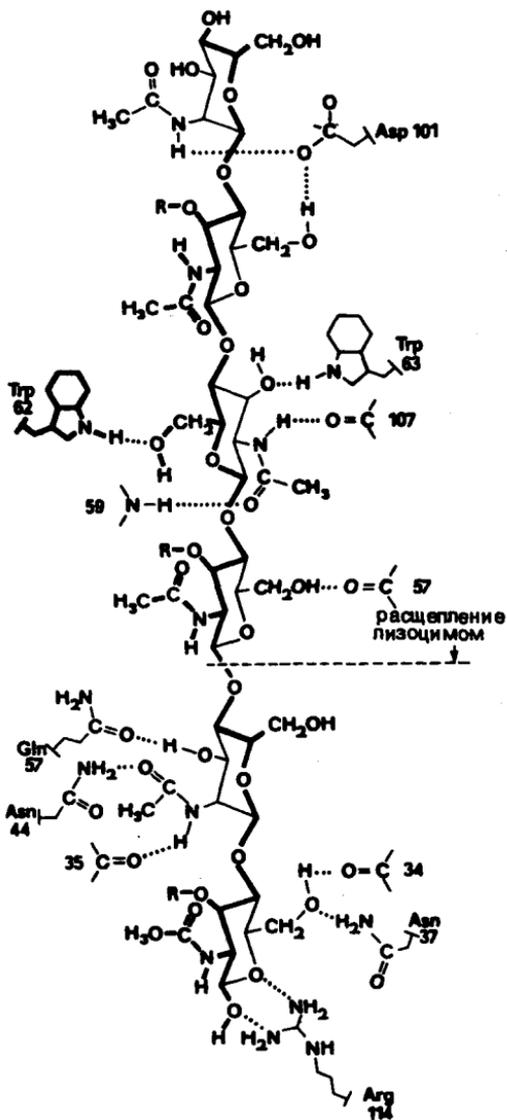


Рис. 3-29. Аминокислоты, принимающие участие в образовании активного центра лизоцима [4].

рует гидрологическое расщепление пептидогликанов бактериальных мембран по β -1,4-связи между N-ацетилглюкозаминоном и N-ацетилмураминовой кислотой, выполняя тем самым важную защитную функцию против проникновения бактерий в организм.

Животные лизоцимы состоят из одной полипептидной цепи, включающей 129 аминокислотных остатков, гомологичны между собой и, как и в случае рибонуклеазы, при участии 4 дисульфидных мостиков сворачиваются в характерные третичные структуры.

Для установления пространственной структуры выполнен рентгеноструктурный анализ лизоцима из куриного яйца [224].

Поскольку кристалл лизоцима характеризуется тетрагональной сингонией (пространственная группа $P 4_3 2_1 2$) и большая часть углов равна 0 или 180° , потребовалось измерить «всего» 9000 рефлексов. 42% полипептидной цепи представляют собой α -спираль, некоторые участки цепи в неспиральной области образуют β -структуры. Так, например, участок 41 — 54 дает антипараллельную структуру складчатого листа. Субстратсвязывающий центр фермента лежит в длинном желобе на внешней стороне и охватывает минимум 12 совместно действующих аминокислотных остатков (рис. 3-29).

Рентгеноструктурными исследованиями комплексов лизоцима с ингибиторами, например комплекса, состоящего из лизоцима и конкурентного ингибитора N-аце-



Рис. 3-30. Механизм катализа лизоцимом по Филлипсу.

тилглюкозаминтрисахарида, были получены более детальные представления об активном центре фермента [225]. Распределение электронных плотностей получено из данных так называемого *дифференциального синтеза Фурье*; для трех различных ингибиторных комплексов были получены совпадающие максимумы электронной плотности.

Связывание субстрата изучалось на примере гексасахарида, построенного из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты (рис. 3-29). Модельный субстрат укладывается в глубокий разрез молекулы лизоцима и фиксируется водородными связями. Расщепляемая гликозидная связь субстрата встраивается между карбоксильными функциями глутаминовой кислоты (положение 35) и аспарагиновой кислоты (положение 52); это позволяет закончиться синхронному процессу расщепления связи (рис. 3-30).

3.8.1.3. Химотрипсин

Химотрипсин — наиболее хорошо изученный протеолитический фермент. Он катализирует гидролитическое расщепление пептидной (или сложноэфирной) связи, в образовании которой принимают участие фенилаланин, тирозин или триптофан. Образование химотрипсина происходит в поджелудочной железе; первоначально образуется неактивный химотрипсиноген (зимоген) — резервная форма фермента. Основной компонент, химотрипсиноген А, представляет собой полипептидную цепь из 245 аминокислотных остатков и 5 дисульфидных мостиков. Активация и образование активного α -химотрипсина осуществляются сложным путем. После триптического расщепления связи $\text{Arg}^{15}\text{-Ile}^{16}$ последовательно один за другим из молекулы отщепляются дипептиды $\text{Ser}^{14}\text{-Arg}^{15}$ и $\text{Thr}^{147}\text{-Asn}^{148}$. В результате одиоцепочечный предшественник переходит в трехцепочечную молекулу фермента. Цепи А, В и С химотрипсина соединены исключительно дисульфидными связями. Рис. 3-32 показывает пространственную модель химотрипсина, установленную на основе рентгеноструктурных данных.

Ферментативное действие химотрипсина, как и других панкреатических протеаз (трипсина, эластазы), соответствует механизму общего кислотно-основного катализа, в котором принимают участие в качестве «системы переноса заряда» остатки аминокислот His^{57} , Asp^{102} и Ser^{195} . Передача электронной плотности от заряженной при pH 8 отрицательно карбоксильной группы аспарагиновой кислоты через имидазольное кольцо гистидина к кислороду боковой цепи серина обуславливает повышение его нуклеофильности настолько, что может осуществляться нуклеофильное воздействие на карбонильный углеродный атом пептидной связи. На промежуточно образующемся О-ацильном производном серина перенос заряда обрывается, но на последующей стадии деацилирования снова немедленно восстанавливается. Гидролитическое расщепление пептидной связи может быть рассмотрено как перенос ацила, при котором осуществляется перемещение ацильного остатка с аминогруппы на молекулу воды (рис. 3-31).

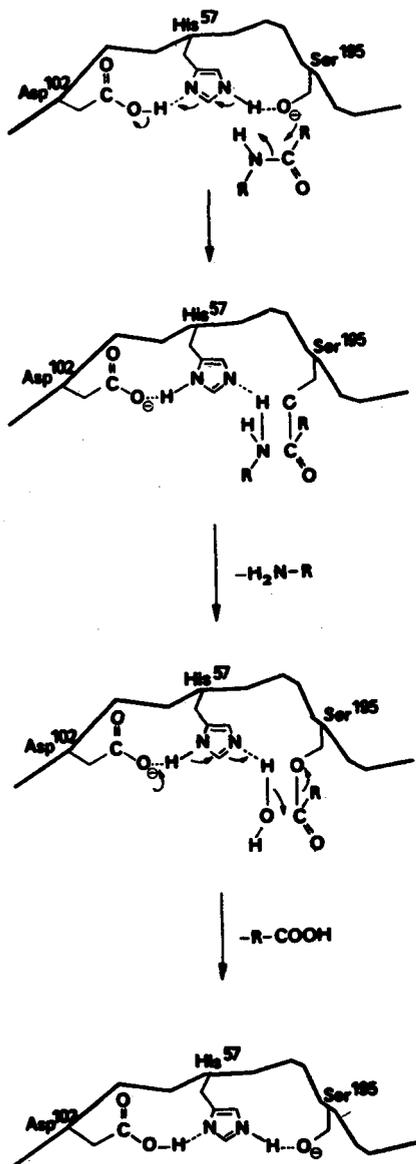


Рис. 3-31. Протеолиз, катализируемый химотрипсином.

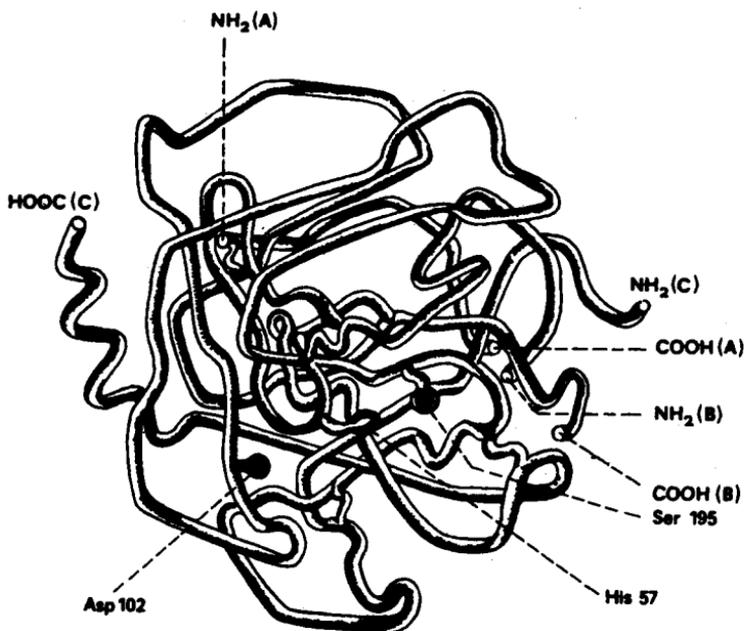


Рис. 3-32. Трехмерная структура химотрипсина [226, 227].

3.8.1.4. Карбоксипептидаза А

Карбоксипептидаза А — это металлофермент, который, будучи экзопептидазой, гидролитически отщепляет С-концевые, прежде всего ароматические, остатки аминокислот. Для работы фермента необходим ион Zn^{2+} , который с некоторыми ограничениями может быть замещен на ионы других переходных металлов.

Карбоксипептидаза А образуется под действием трипсина из неактивного предшественника — прокарбоксипептидазы (M 87 000). Полипептидная цепь фермента состоит из 307 аминокислот (M 34 409) и содержит один дисульфидный мостик.

По данным рентгенографического анализа [228, 229] молекула фермента имеет эллиптическую форму размером $5,2 \times 4,4 \times 4,0$ нм. Внутри молекулы находится β -структура, состоящая из 8 параллельных и 8 антипараллельных участков и обрамленная с обеих сторон 8 спиральями.

Ион цинка лежит в одной из складок на поверхности и принимает активное участие в каталитическом процессе. Он образует координационные связи с остатками гистидина (положения 69 и 196), глутаминовой кислоты (положение 72), а также с карбонильным кислородом расщепляемой пеп-

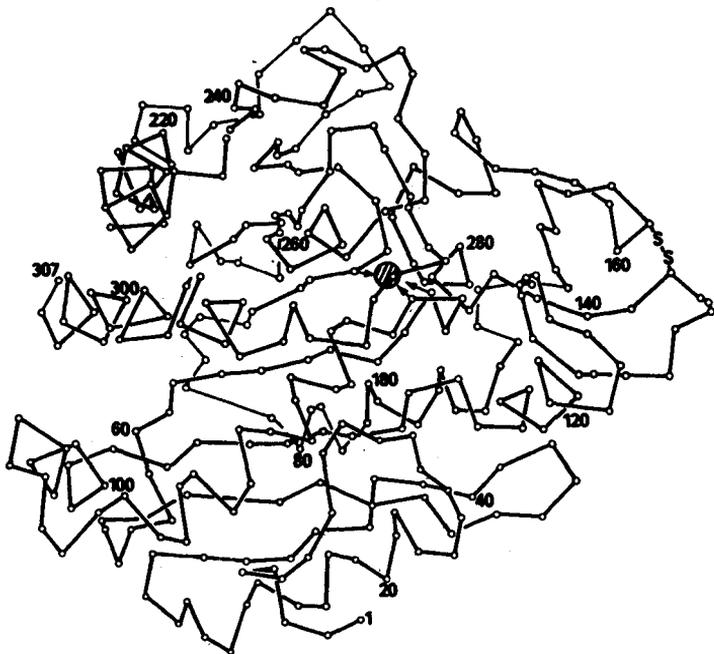


Рис. 3-33. Укладка полипептидной цепи в карбоксипептидазе А.

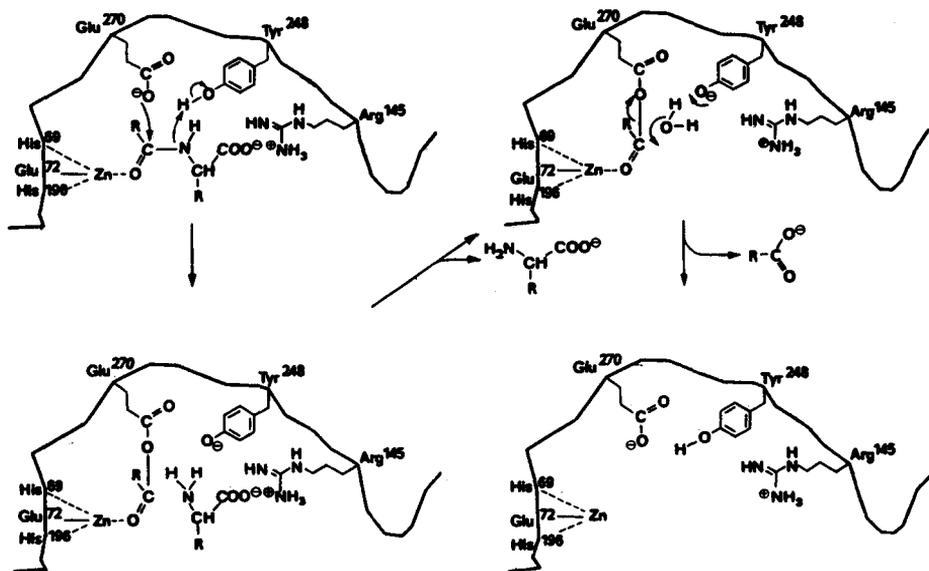


Рис. 3-34. Каталитическое отщепление С-концевой аминокислоты карбоксипептидазой А.

тидной связи. Дисульфидный мостик, идентифицированный рентгеноструктурным анализом с разрешением 0,2 нм, связывает цистеины в положениях 138 и 168 [223]. Из рентгеновских данных далее очевидно, что остаток аргинина-145 связывает С-концевой карбоксилатный анион субстрата. Одновременно благодаря тому, что позиция аргинина изменяется, остаток тирозина-248 может принять роль донора протона для группы NH расщепляемой цепи. Остаток глутаминовой кислоты-270 благоприятствует нуклеофильной атаке молекулы воды на карбоксильную группу пептидной связи, сильно поляризованную координацией с ионом цинка. Механизм действия карбоксипептидазы поясняет рис. 3-34.

3.8.2. Транспортные и резервные белки

3.8.2.1. Миоглобин

Миоглобин — первый глобулярный белок, пространственная структура которого установлена рентгенографически [231]. Поскольку к моменту начала исследований первичная структура миоглобина была еще не известна, установление первичной и третичной структур должно было проходить параллельно. По Эдмундсону [232], миоглобин состоит из одной полипептидной цепи, включающей 153 аминокислотных остатка, и одной железопорфириновой группы (гем) на молекулу. Миоглобин относится к гемопротейнам, могущим обратимо связывать кислород; в клетках скелетной мышцы он

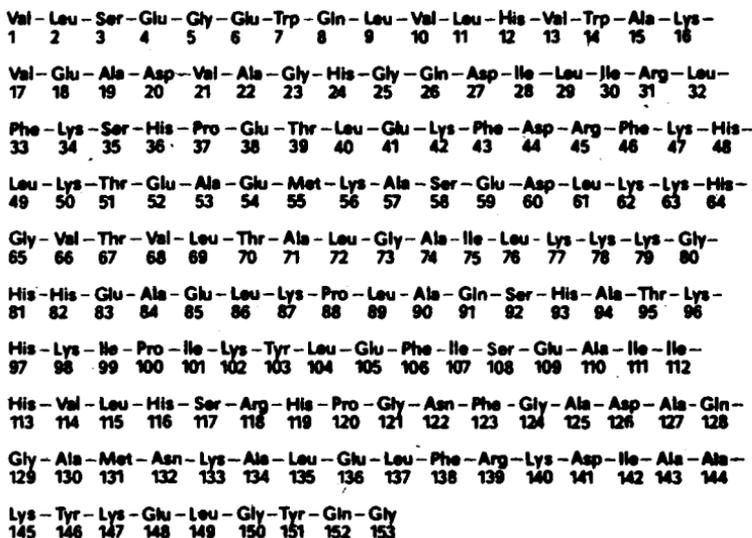


Рис. 3-35. Первичная структура миоглобина кашалота [232].

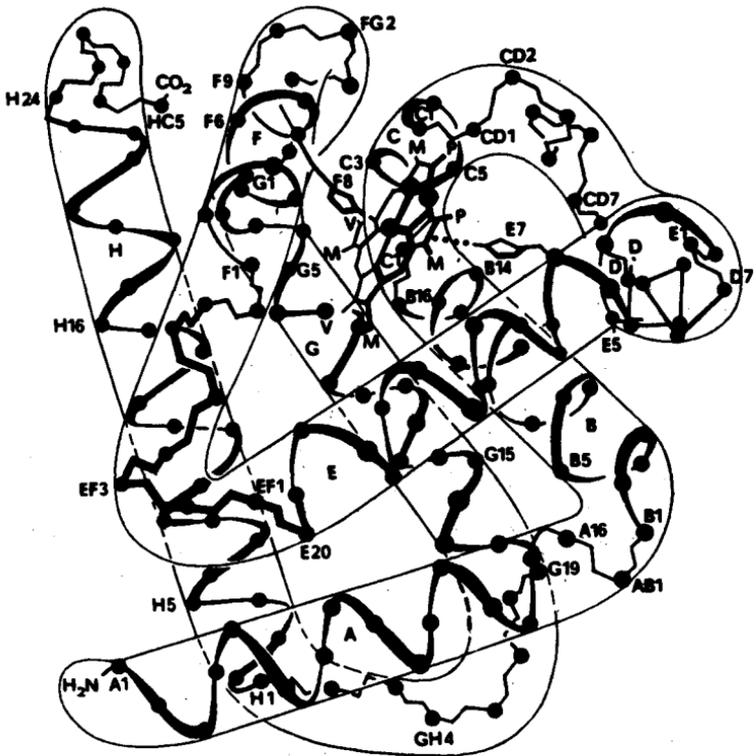


Рис. 3-36. Схема структуры миоглобина кашалота с выделением спиральных областей [233].

ответствен за резервирование кислорода, а также за увеличение скорости его диффузии через клетки. Филогенетически миоглобин — предшественник гемоглобина.

Рентгеноструктурный анализ, проведенный с разрешением 0,6, 0,4 и 0,2 нм, дал форму сплюсненной сферы размером $2,5 \times 4,4 \times 4,4$ нм с «карманом» для гема. Молекула не содержит дисульфидных связей и характеризуется α -спиральностью на 77%. Выделяют 8 спиральных областей (A — H), в построении которых принимает участие в сумме 121 аминокислотный остаток.

При разрешении 0,2 нм впервые удалось наблюдать «визуально» правовращающий α -винт. Рис. 3-37 показывает распределение электронной плотности в цилиндрической проекции среза одной из цепей миоглобина. На верхней части рисунка на карту электронной плотности нанесена α -спираль (а), а ниже дано пояснение расположения атомов в α -спирали, причем точки β и β' соответствуют двум возможным местам расположения β -углеродных атомов (б).



Рис. 3-37. Распределение электронных плотностей на одном из участков полипептидной цепи миоглобина (по Кендрю и др.).

Гем, ответственный за связывание кислорода, находится в «гидрофобном кармане», образованном особыми, для этого предназначенными аминокислотами. Гем представляет собой макроцикл протопорфирина с координационно связанным ионом двухвалентного железа, находящимся в центре молекулы. Ион железа координационно связан с четырьмя расположенными по сфере атомами азота протопорфирина и двумя остатками гистидина (F8 и E7), относящимися к глобиновому компоненту. Такая пространственная фиксация гема делает возможным связывание молекулы кислорода в качестве шестого лиганда со стороны гема, повернутой к гистидину F8. Имидазольное кольцо гистидина E7 непрямо, через молекулу кислорода, координирует с центральным ионом железа (II) (рис. 3-38).

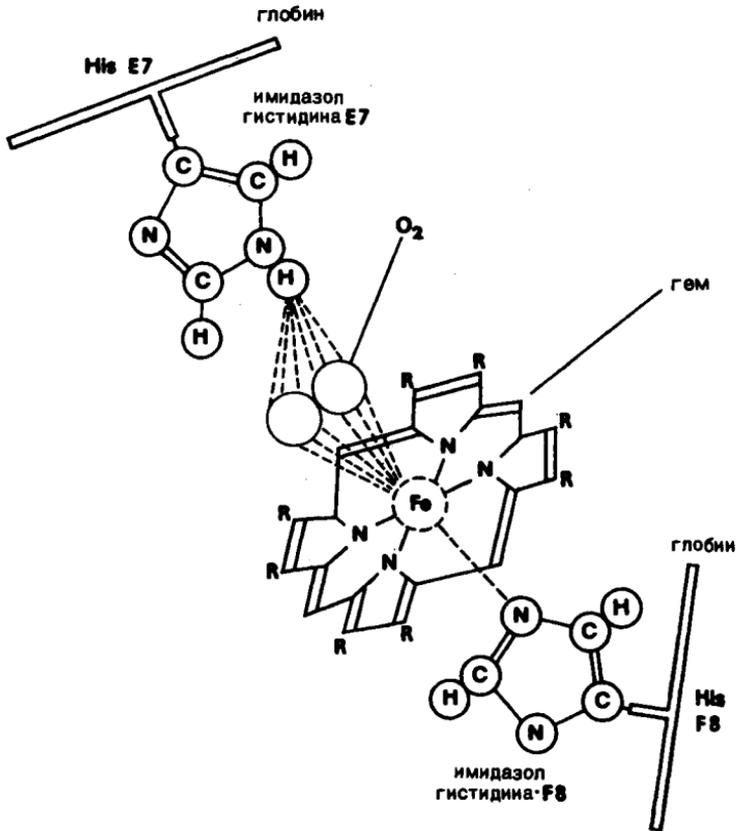


Рис. 3-38. Схема связывания кислорода миоглобином.

3.8.2.2. Гемоглобин [234, 235]

Гемоглобин — «дыхательный» белок крови. Он осуществляет транспорт кислорода по кровеносной системе легких к другим органам и центрам потребления. Например, в мускульных тканях транспортируемый кислород передается миоглобину, который осуществляет его накопление.

Гемоглобин по своему строению гомологичен миоглобину и практически представляет собой тетрамер миоглобина — оба белка действуют взаимосвязанно в биологических системах. Такая кооперация в действии, помимо прочего, требует от гемоглобина высокого сродства к кислороду при его высоком парциальном давлении и низкого сродства при недостатке кислорода. Рис. 3-39 графически демонстрирует связывание кислорода гемоглобином и миоглобином. Форма кривой сигмоидная для гемоглобина и гиперболическая с крутым подъемом для миоглобина.

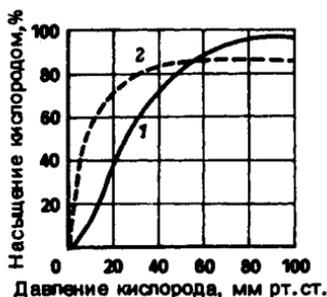


Рис. 3-39. Кривая связывания кислорода гемоглобином и миоглобином при 37 °С и рН 7,4. 1 — гемоглобин человека, 2 — миоглобин человека.

Вследствие этого миоглобин насыщается кислородом уже при низком парциальном давлении, таким образом при сокращении мышц может быть компенсирован недостаточный приток кислорода из кровеносной системы.

Молекула гемоглобина состоит из четырех попарно идентичных полипептидных цепей, каждая из которых несет гем. Сворачивание полипептидной цепи и фиксирование гема осуществляются по тем же принципам, что и в миоглобине. M 64 500, содержание железа 0,334%. В крови взрослого человека содержится ~ 1 кг гемоглобина.

Полипептидные цепи гемоглобина называют α и β , а двойное симметричное строение молекулы записывают как $\alpha_2\beta_2$. Цепи α и β химически сходны или, обобщая, гомологичны. В крови взрослых помимо основного гемоглобина HbA (96,5 — 98,5%) присутствует в незначительных концентрациях гемоглобин HbA₁ ($\alpha_2\delta_2$). Кроме того, в процессе индивидуального развития (онтогенеза) человека образуются два других гемоглобина. Так, в первые недели после оплодотворения доказано образование так называемого эмбрионального гемоглобина, или прегемоглобина (HbF, $\alpha_2\varepsilon_2$), а в крови плода обнаружен так называемый гемоглобин плода (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). Последний вследствие своего повышенного сродства к кислороду облегчает передачу кислорода из материнской крови к плоду. Нужно отметить, что в зависимости от условий развития в молекуле гемоглобина помимо постоянных α -цепей присутствуют две другие идентичные цепи.

В первичной структуре α -, β - и γ -цепей находят многочисленные гомологичные области. β -, γ -, а также δ -цепь построены каждая из 146 аминокислотных остатков; α -цепь на 5 остатков короче. Для анализа степени гомологичности различных полипептидных цепей необходимо рассматривать более короткие последовательности. Различие между α - и β -цепями гемоглобина незначительно, в то время как между этими цепями и цепью миоглобина оно намного существеннее (рис. 3-40).

Гемоглобины людей разной расовой принадлежности, а также гемоглобин шимпанзе одинаковы. Точечные мутации приводят иногда к аномали-

β	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn			Val	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Leu	Asn	Leu			
γ	Gly	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn			Val	Glu	Asp	Ala	Gly	Gly	Glu	Thr	Leu			
М	Gly		Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Trp	Gln	Leu	Val	Leu	His	Val	Trp	Ala	Lys	Val	Glu	Pro	Asp	Val	Ala	Gly	His	Gly	Asp	Ile	Leu				
																														30			
α	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu	Ser	His										40		
β	Glu	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro		50			
γ	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Met	Gly	Asn	Pro		60		
М	Ile	Arg	Leu	Phe	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Glu	Met	Lys	Ala	Ser	Glu		70			
α	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	80		
β	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu		90			
γ	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Val	Leu	Ser	Leu	Gly	Asp	Ala	Ile	Lys	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Gln	Leu		100			
М	Asp	Leu	Lys	Lys	His	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	His	Glu	Ile	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu		110		
α	Ser	Asp	Leu	His	Ala	Ile	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	120
β	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	His	Phe	Gly	Lys		
γ	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Ile	Phe	Gly	Lys		
М	Ala	Gln	Ser	His	Ala	Thr	Lys	His	Lys	Ile	Pro	Ile	Lys	Tyr	Leu	Glu	Phe	Gln	Ser	Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Asn	Ser	Lys	His	Pro	Gly		
																															130		
α	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg								
β	Glu	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Gln	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	Ile	His	Lys	Tyr	His							
γ	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Gln	Ala	Ser	Trp	Gln	Lys	Met	Val	Thr	Gly	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Arg	Tyr	His								
М	Asn	Phe	Gly	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Ala	Met	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Ala	Ser	Asp	Tyr	Lys	Glu	Leu	Gly	Tyr	Gln	Gly		
																																150	

Рис. 3-40. Сопоставление гомологичных участков первичных структур α-, β-, и γ-цепей гемоглобина и миоглобина человека [236].

ям, чаще всего паталогическим. Наиболее известен гемоглобин серповидных эритроцитов, возникающий при замене глутаминовой кислоты в положении 6 на валин и вызывающий деформацию клеток и их агрегацию.

Структура оксигемоглобина лошади при грубом разрешении установлена Перутцем с сотр. [237, 238]. Хотя при разрешении 0,55 нм (6 изоморфных производных, 1200 рефлексов) оказалась невозможной непосредственная локализация отдельных аминокислотных остатков, было однозначно показано тетрамерное строение молекулы и положение четырех гемов. На основании этих данных α - и β -цепи обладают почти идентичной третичной структурой, очень близкой структуре миоглобина.

В более уточненной модели (0,2 нм) Перутц описал положение всех $\sim 10\,000$ атомов с погрешностью $\pm 0,1$ нм. Из всех имеющихся структурных данных для оксигенированного и неоксигенированного гемоглобинов можно сделать вывод, что третичная структура гемоглобина не имеет видоспецифичности.

Образование четвертичной структуры осуществляется прежде всего путем гидрофобных взаимодействий между отдельными полипептидными цепями. Возникают расширенные области контактов между α - и β -цепями, которые вместе с этнм являются предпосылкой для обратимого кооперативного связывания гемоглобином четырех молекул кислорода. При присоединении кислорода к гемму образуется оксигемоглобин, четвертичная структура которого лишь незначительно отличается от неоксигенированной формы. α -Гемы взаимно сближаются на 0,1 нм, а β -гемы удаляются один от другого на 0,65 нм.

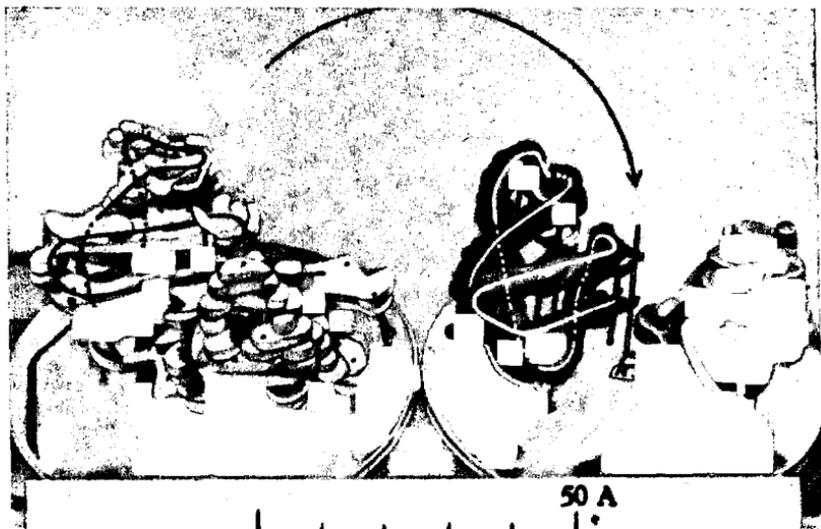


Рис. 3-41. Модели четырех протомерных полипептидных цепей гемоглобина [237, 238].

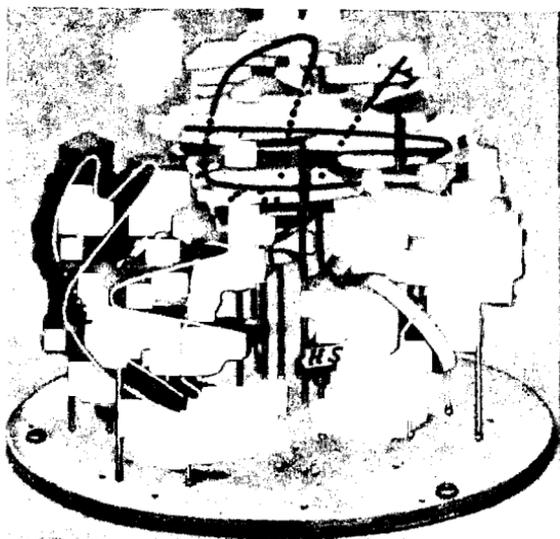


Рис. 3-42. Модель структуры оксигемоглобина лошади (разрешение 0,55 нм) [237, 238].

Структурные изменения одной субъединицы влияют на пространственное строение всей молекулы и тем самым на другие пространственно удаленные геммы. Контактные области дают возможность обоим димерам ($\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$) в процессе связывания кислорода скользить один по другому. Этот аллостерический эффект объясняет сигмоидную форму кривой оксигенации [239, 240].

Большое сходство в третичной структуре с гемоглобином и миоглобином показывает выделенный из личинок одного из видов комара *Chironotus* эритрокруорин, пространственная структура которого установлена Хубером и др. [241]. Высокая способность этого гемопротейна связывать кислород позволяет личинкам комара находиться в водной среде, бедной кислородом.

3.8.2.3. Металлопротеины

Ряд белков характерен своей способностью специфично связывать ионы металла. Ионы металла находят прежде всего в качестве функционирующей составной части ферментов, например ион меди в группе оксидоредуктаз (фенолоксидазы, цитохромоксидазы и др.) и ион марганца в аргиназе и

фосфотрансферазах. Особый интерес вызывают содержащие ионы железа и молибдена белковые компоненты *нитрогеназы* — мультиферментного комплекса, имеющегося в микроорганизмах, способных связывать атмосферный азот. В качестве примера цинксодержащего фермента можно назвать карбоангидразу.

Типичными накапливающими железо белками млекопитающих являются *ферритин* и *гемозидерин*, несущие четверть всего железа, содержащегося в организме. Лишенный железа апоферритин имеет форму чашки и состоит из 24 субъединиц ($M\ 445\ 000$). Железо в ферритине представлено в форме железогидроксидоксидных мицелл, причем на молекулу может приходиться до 4300 атомов $Fe(III)$. С помощью ферритина избыточное железо накапливается внутри клеток в различных органах (печень, костный мозг, селезенка) и при появлении потребности мобилизуется действием NADH-зависимой ферридуктазы.

Функционально очень близок к ферриту гемозидерин, образующийся, в частности, при определенных заболеваниях и откладывающийся прежде всего в печени и селезенке. Содержание железа в гемозидерине, например, из селезенки лошади может составлять до 34%.

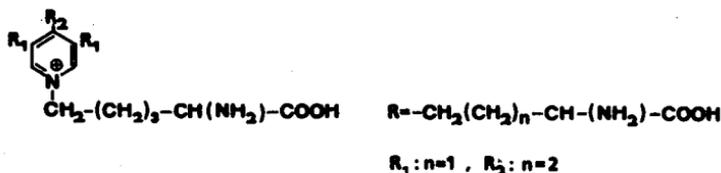
Важными металлотранспортными белками являются *зидерофилины* и *церулоплазмин*. В первом случае речь идет о безгемовых связывающих железо гликопротеинах (трансферрин плазмы, лактоферрин, кональбумин), выполняющих преимущественно транспортные функции и действующих бактериостатически. Трансферрин относится к β -глобулинам плазмы крови и ответствен за транспорт принятых с пищей ионов железа к органам, осуществляющим его хранение. Окрашенный в голубой цвет церулоплазмин осуществляет как транспорт, так и накопление ионов. Это состоящий из четырех цепей $\alpha_2\beta_2$ -гликопротеин, содержащий 8 ионов меди на молекулу. Белок, существующий в плазме млекопитающих, имеет $M \approx 140\ 000$ и содержание углеводов 16%.

3.8.3. Структурные белки

Структурные белки объединяют те фибриллярные белки, которые в животных организмах выполняют типичные опорную и каркасную функции. Они имеют характерный аминокислотный состав, нерастворимы в воде и не атакуются протеолитическими ферментами. Вследствие плохой усвояемости и низкого содержания важных аминокислот они не подходят в качестве пищевых белков.

У структурных белков находят следующие типы конформаций полипептидных цепей: α -спираль, β -структуру складчатого листа и суперспираль. Важнейшие представители этих белков — кератины, белки шелка и коллагены. В ряде других структурных белков особые физические свойства достигаются благодаря трехмерным сшивкам полипептидных цепей ковалентными мостиками. *Резилин*, белковый компонент хитиновых пластинок, содержащийся, в частности, в местах приращения крыльев насекомых,

придает, например, наружному скелету специфическую гибкость. Поперечная сшивка цепей осуществляется через три остатка тирозина. *Эластин*, структурный белок «эластичных» компонентов сухожилий, сосудов и др., характеризуется высоким содержанием гидрофобных аминокислот (суммарное содержание валина, лейцина и изолейцина равно 27%). В данном случае прочность и эластичность вызваны сшивками через пиридинамино-кислоту *дезmozин*.



Сшивка осуществляется после биосинтеза белка при участии боковой цепи лизина. В кислом гидролизате эластина найдена другая «сшивающая» аминокислота — *изодезmozин*, имеющий остаток R_2 в положении 2 (а не в 4) пиридинового кольца.

3.8.3.1. Кератины

Кератин шерсти и волос имеет в качестве основного структурного элемента α -спиральные полипептидные цепи, стабилизированные водородными связями и межспиральными дисульфидными мостиками. Аминокислотный состав этого α -кератина обнаруживает высокое (11%) содержание цистеина и гидрофобных аминокислот.

Каждые три правовращающих α -спирали навиты одна на другую в стержнеобразную структуру, получившую название *протофибрилла* и имеющую диаметр 2 нм. Из-за скручивания период идентичности сокращается от 0,54 нм для нормальной α -спирали до 0,51 нм. С помощью электронной микроскопии удалось показать, что каждые 9 протофибрилл накладываются кольцевыми витками на 2 других, образуя при этом структуру, похожую на кабель, называемую *микрофибриллой* и имеющую диаметр 8 нм. Многие сотни микрофибрилл, уложенных для увеличения механической прочности в богатую цистеином белковую матрицу, снова образуют так называемые *макрофибриллы* с диаметром 200 нм. Макрофибриллы лежат параллельно оси волокна в отмерших клетках *шерсти*. Конечный диаметр всей структуры достигает 20 000 нм.

Исключительными свойствами волокна шерсти являются растяжимость и эластичность. При сильном растяжении α -спирали растягиваются с разрывом водородных связей до длины, равной удвоенной первоначальной. Эластичность основана на сшивке спиралей дисульфидными мостиками.

В противоположность волокнам шерсти волокна природного шелка растягиваются незначительно. Полипептидные цепи *фиороина* шелка содержат в основном глицин, аланин и серин (~87%). Другие аминокислоты

присутствуют в незначительных концентрациях, а цистеин и метионин отсутствуют полностью. Фиброин шелка — представитель β -кератинов.

В антипараллельных, прилегающих одна к другой полипептидных цепях преобладает повторяющаяся последовательность $-\text{Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala}$. Цепи образуют антипараллельную β -структуру, стабилизированную оптимальным образованием водородных связей между CO- и NH- группами. При этом остатки глицина выступают с одной, а серина и аланина — с другой стороны складчатого листа. Расстояния между отдельными листами равны примерно 0,35 и 0,57 нм.

Совместная укладка пар полипептидных цепей приводит к образованию пространственно вытянутого белкового комплекса, укрепленного серицином — вторым (однако водорастворимым) белком шелка. Характерные свойства волокна шелка — незначительная растяжимость и высокая эластичность объясняются прочными ковалентными связями вытянутых полипептидных цепей и слабыми вандерваальсовыми взаимодействиями между листами β -структур.

3.8.3.2. Коллагены [243 — 247]

Коллагены — наиболее часто встречающиеся белки животных организмов (составляют 25 — 30%). Они входят в состав сухожилий, кожи, хрящей,

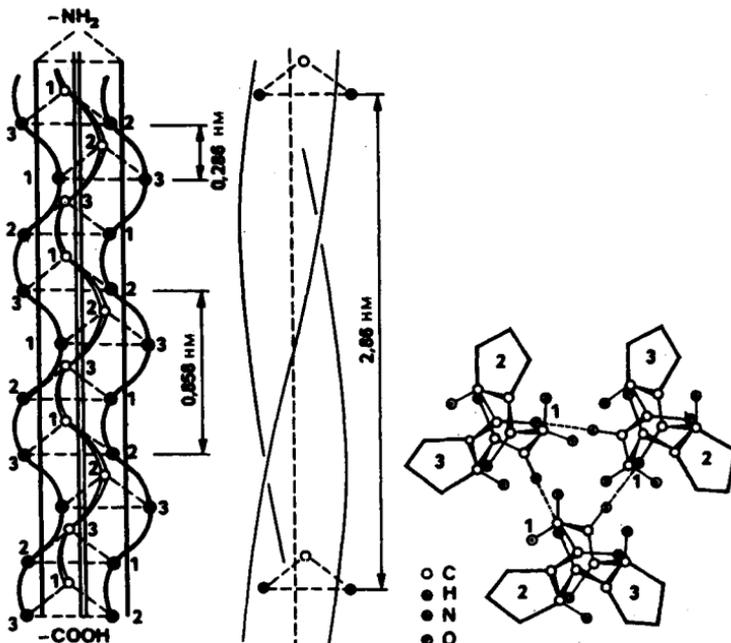


Рис. 3-43. Структура коллагена (по Ричу и Крику).



Рис. 3-44. Электронно-микроскопический снимок фибрилл коллагена [248].

стенок сосудов и связывающих тканей. Содержание пролина и гидроксипролина необычайно высоко и составляет 9 — 12%, но больше всего в коллагенах глицина (35%) и аланина (11%), цистеин и метионин содержится только в коллагенах беспозвоночных. Примечательно присутствие гидроксисилизина и 1 — 2% углеводов.

Основной структурный элемент коллагена — палочкообразные молекулы *тропоколлагена* (M 300 000, длина 3000 нм и диаметр 1,5 нм). Тропоколлаген построен из трех полипептидных цепей примерно равной длины, из которых две обычно идентичны и называются α_1 -цепями. Коллаген хрящей содержит три идентичные α_1 -цепи, в то время как все цепи коллагена

из кожи тунца различны. Установление аминокислотной последовательности показало, что α_1 -цепь состоит из 1012 аминокислотных остатков и имеет $M \approx 1000\ 000$. Цепи тропоколлагена находятся в форме левовращающей вытянутой спирали, причем каждые три аминокислотных остатка образуют один виток; период идентичности 0,86 нм. Структуру определяют последовательности $(\text{Gly-X-Pro})_n$, $(\text{Gly-X-Hyp})_n$ и $(\text{Gly-Pro-Hyp})_n$, которые обуславливают скручивание трех отдельных цепей в *правовращающую суперспираль*. Спиральная структура в этом случае стабилизируется водородными связями между пептидными группами отдельных цепей. Эти связи могут относительно легко разрушаться, например, при нагревании водного раствора. Из охлажденного раствора, застывающего подобно желатине, можно выделить α_1 -цепи.

Тропоколлаген укладывается в фибриллы диаметром до 500 нм. В каждой фибрилле отдельные молекулы уложены параллельно и смещены одна относительно другой на 1/4 длины, при этом на поверхности фибриллы образуется типичный *поперечнополосатый рисунок*. В зависимости от типа коллагена расстояние между полосками равно от 60 до 70 нм.

Фибриллы можно сделать видимыми в электронном микроскопе после окрашивания солями тяжелых металлов или наблюдать с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния. Реакцией с фосфорновольфрамовой кислотой, солями уранила или хрома(III) полярные области соседних основных элементов коллагена сшиваются между собой на многих участках.

В процессе биосинтеза коллагена в фибробластах сначала образуется водорастворимый протоколлаген, не содержащий гидроксипролина и гидроксизина. Обе гидроксиаминокислоты образуются позднее при действии на молекулу белка особой проколлагенгидроксилазы. После спонтанного образования трехспиральной структуры в молекулу через ОН-группы гидроксизина встраивается углеводный компонент (галактоза, глюкоза). Окончательное формирование коллагеновой фибриллы происходит во внеклеточном пространстве после секреции предшественника.

3.8.4. Белки с защитными функциями

3.8.4.1. Иммуноглобулины

При проникновении посторонних белков или других антигенных компонентов, например макромолекулярных углеводов, в организме животных начинает действовать защитный *механизм антиген — антитело* (иммунный ответ). В процессе этой оборонительной реакции индуцируется биосинтез особых белков, так называемых *антител*, которые посредством высокоспецифичных рецепторов соединяются с антигенами с образованием нерастворимого комплекса антиген — антитело, делая проникший антиген безопасным для организма [249 — 252].

Реакция антиген — антитело наиболее подробно изучена на иммуноглобулинах — антителах, образующихся в плазме крови. Эти «защитные белки» находятся в γ -глобулиновой фракции плазмы. Речь идет о гли-

Таблица 3-11. Классификация иммуноглобулинов человека (Ig) [253]

Свойство	IgG	IgM	IgA		IgD	IgE
			сыворот- ка	секрет		
Коэффици- ент седимента- ции	6,5—7S	19S	7S	11S	6,8—7,9S	8,2S
Мол. масса (L-цепь, всегда 23 000)	155 000	940 000 Пентамер	170 000	380 000 Димер	185 000	196 000
Тип H-це- пей и мол. масса	$\gamma 1-\gamma 4$ 50 000— 60 000	μ 71 000		α 64 000	δ 60 000— 70 000	ϵ 75 500
Состав $L_2\gamma_2$ (L = χ или λ)		$(L_2\mu_2)_5$	$L_2\alpha_2$	$(L_2\alpha_2)_2$	$L_2\delta_2$	$L_2\epsilon_2$
Содержание углеводов, %	2—3	10—12		8—10	12,7	10—12
Доля отно- сительно им- муноглобули- нов сыворот- ки, %	70—75	7—10		10—22	0,03—1	0,05
Концентра- ция в сыво- ротке (мг/100 мл)	1300 (800—1800)	140 (60—280)	210 (100— 450)		3 (1—40)	0,03 (0,01— 0,14)
Валент- ность при свя- зывании	2	5(10)	1	2	?	2
Полупериод биологического действия, сут	8(IgG 3)—21	5,1	5,8		2,8	2—3
Связывание комплемента	Да	Да	Нет		Нет	Нет

копротеннах с различными молекулярными массами и различным содержанием углеводов, которые можно в значительной степени разделить иммуноэлектрофорезом и разбить на пять основных групп.

Каждый иммуноглобулин построен из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей, которые в каждом случае соединены одна с другой двумя дисульфидными связями.

IgG-глобулины (γ_{7S}), называемые ранее легкими антителами, имеют M 155 000 и коэффициент седиментации 7S. С помощью протеолиза папаином и последующего

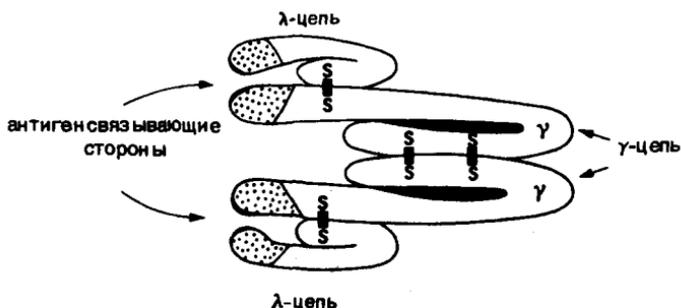


Рис. 3-45. Структура иммуноглобулина IgG.

восстановления они могут быть расщеплены на две полипептидные λ-цепи с M 23 000 (ранее называемые L-цепями, от light — легкий) и две полипептидные γ-цепи с M 50 000 + 60 000 (ранее называемые H-цепями от heavy — тяжелый). Расщепление обратимо, так как после разделения λ- и γ-цепей они могут вновь соединяться в интактную иммунологически активную молекулу $\gamma_2\lambda_2$. Специфичность молекулы достигается характерной аминокислотной последовательностью в N-концевой области полипептидной цепи до 107 остатка (варибельная область). В С-концевой области цепи находится в основном константный участок последовательности.

Известна первичная структура ряда иммуноглобулинов IgG- и IgM-типов, а также белка Бенса — Джона (иммуноглобулина L-типа), появляющегося в моче при определенных заболеваниях (например, при миеломе). Этот белок, находящийся в растворе в виде димера, содержит 214 аминокислот. В нем отсутствуют метионин и спиральная структура. Некоторое представление о третичной структуре антитела удалось дать Эдмунсону и Хиллману [254]; они сделали рентгеноструктурный ана-

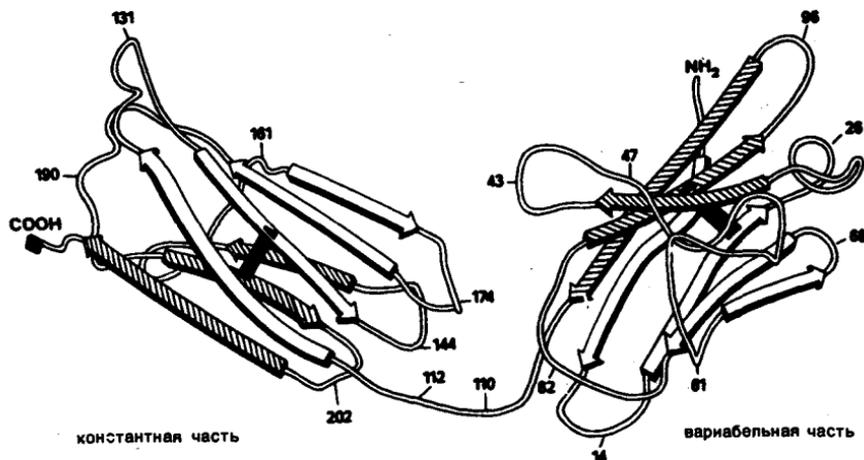


Рис. 3-46. Схема конформации белка Бенса — Джона L-типа (разрешение 0,35 нм).

лиз белка Бенса — Джонса с разрешением 0,35 нм (рис. 3-46). Можно видеть оба домена с варибельной областью (всего 111 аминокислотных остатков) и константной областью (всего 105 аминокислотных остатков). Каждый из доменов содержит по два слоя антипараллельных отрезков цепи, представляющих собой β -структуры и показанных на рисунке стрелками. Оба домена добавочно стабилизируются дисульфидными связями (показаны черными) и связаны между собой через растянутую структуру.

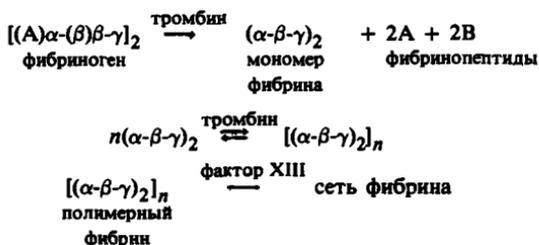
Полного понимания молекулярного механизма образования антител пока не существует. По матричной теории Полинга каждая клетка, образующая антитела, может синтезировать неограниченное число различных структур, а по теории выбора клона, предложенной Бурнетом, генетическая информация о числе и структуре молекул антител содержится в ДНК. Современные представления о структурных основах образования и действия антител изложены в работе [255].

3.8.4.2. Фибриноген — фибрин

Особенно важную защитную функцию выполняют белки в процессе свертывания крови у позвоночных. На последней стадии этого сложного процесса, включающего 12 факторов (из них 11 белковых) и начинающегося при повреждении сосуда, растворимый белок плазмы *фибриноген*, синтезируемый в печени, переходит в фибрин, закрывающий рану.

Фибриноген содержится в человеческой плазме в концентрации 200 — 300 мг на 100 мл и составляет приблизительно 3 — 4% суммарного содержания плазменных белков. В образовании молекулы, состоящей из двух идентичных субъединиц, принимают участие три пары полипептидных цепей ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), лежащих параллельно одна другой и сшитых между собой в N-концевой области многими дисульфидными связями. Отдельные цепи имеют различный размер (для α -цепи M 67 000, для β -цепи — 56 000 и γ -цепи — 47 000). Фибриноген имеет M 340 000 (по данным малоуглового рентгеновского рассеяния в растворе $335\ 000 \pm 25\ 000$). Предполагается, что его пространственная структура имеет вид вытянутого цилиндра длиной 45 нм и диаметром 9 нм. Гидратация фибриногена (5 г воды на 1 г белка) необычно высокая для белков.

Переход фибриногена в фибрин осуществляется под влиянием протеазы тромбина в присутствии ионов кальция по следующей схеме:



Сначала от N-концов α - и β -цепей отщепляются один за другим так называемые фибринопептиды А и В, причем отщепление всегда протекает по связи Arg — Gly.

Фибринопептид А человека имеет последовательность Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg; для *фибринопептида В человека* определена последовательность Pyl-Glu-Gly-Val-Asn-Asp-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg. Физиологическая функция фибринопептидов, помимо прочего, заключается во временном связывании факторов свертывания крови на месте их действия.

Мономерный фибрин, образующийся при расщеплении, агрегируется в пучки волокон, переходящие затем в стабилизированные водородными связями фибриновые сгустки. Транспептидаза, образующаяся под действием фактора свертывания крови XIII из четырехцепочечного α_2 -глобулина M 350 000, осуществляет ковалентную сшивку сгустков фибрина, замыкая изопептидные связи между γ -карбоксильными и ϵ -аминогруппами боковых цепей остатков глутаминовой кислоты и лизина. Образующийся полимер фибрина нерастворим в воде и 8 М растворе мочевины. Обратный процесс растворения сгустков фибрина идет под действием *плазмина* (фибринолизин) — трипсиноподобной протеазы, протеолитически расщепляющей фибрин до растворимых продуктов. Сам плазмин образуется из неактивного предшественника плазминогена при его специфической активации урокиназой почек (M 53 000) или стрептокиназой (M 47 000) из β -гемолитических стрептококков.

3.8.4.3. Лектины

Лектины (от лат. *legere* — выбирать) — гликопротеины, в отдельных случаях безуглеводные белки, прежде всего растительного происхождения, характеризующиеся особыми способностями связывать углеводы и углеводсодержащие поверхности клеток. Из-за их способности агглютинировать эритроциты и другие клеточные структуры они также имеют название *фитогемогглютинины*. Белковый компонент обычно состоит из нескольких субъединиц. Характерным в аминокислотном составе является отсутствие серусодержащих аминокислот и повышенное содержание серина и треонина. Через эти аминокислоты осуществляется связывание углеводного компонента, среднее содержание которого составляет 5% и состав ограничивается в основном моносахаридами галактозой, маннозой, фукозой и N-ацетилглюкозаминном.

Молекулярное взаимодействие между лектинами и посторонними углеводами сравнимо с реакцией антиген — антитело в человеческом и животных организмах. Однако специфичность лектинов шире, и, что является наиболее важным отличием, они содержатся в соответствующем растении постоянно, т. е. их образование не индуцируется контактом с остатком сахара.

Биологические функции лектинов многообразны и еще не выяснены во всех деталях. Их защитное действие у семян заключается в частичной защите от поедания насекомыми. Лектины, связывающие N-ацетилглюкозамин, препятствуют образованию хитина при синтезе клеточных стенок в грибах и таким образом защищают растения от инфекции.

Как было показано на примере инфицирования листьев табака непатогенным штаммом бактерии *Pseudomonas solanacearum*, лектины обуславливают фиксацию бактерий на клеточных стенках инфицированных растений.

Похожие бактерии агглютинируются лектином картофеля. Этот лектин с M 92 000 состоит из двух субъединиц и проявляет специфичность к остаткам N-ацетилглюкозамина; имеет необычно высокое содержание углеводов (~ 50%) и содержит гидроксипролин

Многочисленные представители лектинов находятся в растениях из семейства бобовых. Функция этих легиуминовых лектинов состоит в узнавании и фиксации симбиотических бактерий, связывающих азот воздуха. Известный *конканавалин А* (Con A) из бобов был получен в кристаллическом состоянии уже в 1919 г. Он состоит из четырех субъединиц по 238 аминокислот каждая с суммарной M 110 000. Каждая субъединица содержит ион кальция и ион магния. Ионы металлов необходимы как для осуществления процесса связывания углеводов, так и для стабилизации пространственной структуры белка. *Вицилин* из бобов *Phaseolus aureus* Roxb. — гликопротеин с содержанием 0,2% глюкозамина и 1% маннозы. Каждая из четырех субъединиц содержит боковую углеводную цепь из 13 углеводных остатков.

Большое значение для медицины имеет применение лектинов для определения группы крови. Метод основан на избирательном взаимодействии лектинов с эритроцитами систем ABO и MN. Так, например, лектин из *Dolichos biflorus* специфически связывает N-ацетилгалактозамин рецепторов, определяющих группу крови A_1 . Предпочтительная агглютинация раковых клеткок по сравнению со здоровыми используется для определения раковых трансформаций в клеточных культурах. Так, безуглеводный лектин из земляных орехов (M 120 000, 4 субъединицы) лучше связывается с раковыми клетками молочной железы, чем с соответствующими нормальными клетками.

3.8.4.4. Белки, препятствующие замерзанию

Белки, защищающие от замерзания (гликопротеиновые антифризы), — общее название для ряда родственных гликопротеинов, содержащихся в плазме крови антарктических рыб и вместе с солями, прежде всего хлоридом натрия, снижающих точку замерзания плазмы. Присутствие этих белков препятствует застыванию крови и сохраняет жизнедеятельность организма до температуры $-1,85^{\circ}\text{C}$.

При разделении гликопротеинов плазмы электрофорезом получают активную фракцию этих белков, состоящую из 5 компонентов с M 11 000 + 32 000. Все компоненты содержат только аланин и треонин, структура углеводной части соответствует дисахариду D-галактозил-D-N-ацетилгалактозамину.

Анализ аминокислотных последовательностей компонентов активной фракции обнаружил наличие в полипептидных цепях повторяющегося участка -Ala-Ala-Thr- с двумя дополнительными остатками аланина на C-конце полипептидной цепи. Для этих белков предполагается гибкая вытянутая структура, образующая в воде неидеальные и нерегулярные формы и тем самым нарушающая нормальный рост кристаллов льда. Гидрофильная

сторона молекулы гликопротеина образует специфические водородные связи, идущие прежде всего от гидроксильных групп углеводной части.

Помимо активного, защищающего от замораживания белка в плазме содержатся три меньших, неактивных гликопротеина (M 2700 — 7800), у которых в молекуле на каждые два остатка треонина приходится дополнительно один остаток пролина. Их концентрация в крови рыб составляет 10 — 15 мг/мл при суммарном содержании гликопротеинов 25 мг/мл. Их функция, по-видимому, состоит в стимуляции антифризной активности беспролиновых белков плазмы.

3.8.4.5. *Интерфероны*

Интерфероны — это гликопротеины, состоящие из белкового компонента (~ 160 аминокислотных остатков) и специфического углеводного компонента. Они синтезируются в животных клетках после возбуждения экзогенным стимулятором и отличаются антивирусным, клеточно- и иммунорегуляторным действием, а также особыми антиопухолевыми свойствами. Оптимальный эффект достигается в гомологичной или близкородственной системе, поэтому для человека наиболее действенны человеческие интерфероны.

Особое значение имеет антивирусное действие интерферонов, на котором основан главный защитный механизм у человека и животных, действующий против многочисленных вирусных возбудителей. После проникновения вируса в клетку активируется в нормальном состоянии неактивный ген интерферона клетки. Следует перенос информации на мРНК и инициация рибосомного биосинтеза белка в цитоплазме. После завершения синтеза присоединяется углеводный компонент и полная молекула интерферона секретруется клеткой. Взаимодействием со специфическим рецептором на поверхности клетки интерферон индуцирует образование внутриклеточных ферментов, которые препятствуют копированию вирусной информации, т. е. блокируя синтез вирусных белков, прерывают цепь инфекционного процесса.

В противоположность антителам, нейтрализующим чуждую молекулу путем прямого контакта и часто появляющимся во внеклеточном пространстве даже через годы, интерфероны действуют лишь несколько часов. В какой степени кооперируют обе системы одна с другой, в настоящее время еще трудно сказать.

К другим примерам действия интерферона относятся благоприятное влияние на иммунную реакцию организма, например при инфекции и трансплантации органов, активация специфических иммунных клеток, а также подавление очень быстро делящихся клеток, например опухолевых.

Успех при применении интерферона в клинической практике был достигнут при лечении вирусных заболеваний, например хронического гепатита. Применение при терапии рака пока оценивается сдержанно. Успешным было послеоперационное лечение пациентов с остеосаркомой.

Для получения интерферона используются клеточные линии лейкоцитов, фибробластов, побуждаемые к синтезу и выделению интерферона вирусной инфекцией или такими индукторами, как поли(1:С). DEAE-декстран и αGMP-аскорбиновая кислота. Так как в данном процессе выход нужного белка в высшей степени незначителен, особое внимание уделяется генной технологии. Однако в этом случае может образовываться лишь чисто белковый компонент интерферонид.

В зависимости от происхождения интерфероны различаются по аминокислотной последовательности, содержанию сахара, молекулярной массе, антигенной специфичности и фармакологическим свойствам.

Для интерферона из фибробластов человека (*M* 20 000) известна полная аминокислотная последовательность белкового компонента. Установление первичной структуры осуществлено бельгийскими [256] и японскими [257, 258] учеными, причем обе лаборатории исходили из выделенной из фибробластов соответствующей мРНК. По нуклеотидной последовательности была выведена соответствующая аминокислотная последовательность:

I		
		10
	Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-	
		20
	Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr	30
		40
	Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-	
		50
	Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-	60
		70
	Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-	
		80
	Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-	90
		100
	Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-	
		110
	Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-	120
		130
	His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-	
		140
	Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-	150
		160
	Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn	166

Бросается в глаза высокое содержание гидрофобных аминокислот лейцина, изолейцина, тирозина и наличие всего одного остатка пролина. Связывание углеводной части осуществляется, по всей вероятности, через N-гликозидную связь с остатком аспарагина-80 либо через O-гликозидную связь с остатками треонина или серина

Аминокислотной последовательности интерферона предшествует типичная для секреторных белков сигнальная последовательность, селективно отщепляемая во время или сразу после прохождения мембраны. Первичная структура сигнального пептида следующая:

Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Cys-Phe-

Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser

Литература

1. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 1—32, Academic Press, New York, 1944—1978.
2. *Neurath H.*, *The Proteins-Composition, Structure and Function*, Vol. 1—5, Academic Press, New York, London, 1963—1970.
3. *Lübke K., Schröder E., Kloss G.*, *Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine*, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1975.
4. *Dickerson R. E., Geis I.*, *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
5. *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry* (S. J. Leach, Ed.), Part B, Academic Press, New York, 1970.
6. *Fasold H.*, *Die Struktur der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
7. *Legget-Bailey J.*, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1969.
8. *Hoffmann S.*, *Molekulare Matrizen*, Bd. II: *Proteine*, Academic-Verlag, Berlin, 1978.
9. *Haurowitz F.*, *The Chemistry and Function of Proteins*, Academic Press, New York, 1963.
10. *Präve P., Faust U.*, *Chemistry in Britain*, **14**, 552 (1978).
11. *Crahmer R.*, *Wiss. Fortschr.*, **22**, 368 (1972).
12. *Müller H. G., Ruckpaul K.*, *Wiss. Fortschr.*, **22**, 227 (1972).
13. *Voss G.*, *Erdöl-Kohle-Erdgas-Petrochemie m. Brennstoffchemie*, **26**, 249 (1973).
14. *Bauch J. et al.*, *Chem. Techn.*, **30**, 284 (1978).
15. *MacLaren D. D.*, *Fod prod. Dev.*, **9**, 26 (1975).
16. *Faust U. et al.*, *J. Ferment. Technol.*, **55**, 6 (1977).
17. *Hofmeister F.*, *Naturw. Rundsch.*, **17**, 529, 545 (1902).
18. *Fischer E.*, *Chem. Ztg.*, **26**, 935 (1902).
19. *Fischer E.*, *Ber.*, **40**, 1754 (1907).
20. *Ryle A. P. et al.*, *Biochem. J.*, **60**, 541 (1955).
21. *Sanger F.*, *Endeavour*, **16**, 48 (1957).
22. *Alexander P., Block R. J.*, *Analytical Methods of Protein Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1961.
23. *Haschemeyer R. H., Haschemeyer A. E. V.*, *Proteins*, Wiley, New York, 1973.
24. *Niederwieser A., Pataki G.*, *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*, Humphrey, Ann Arbor, Michigan, 1971.
25. *Work T. S., Work E.*, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 1—3, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 1975.
26. *Schwenke K. D. et al.*, *Nahrung*, **21**, 395 (1977).
27. *Cohn E. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946).
28. *Cohn E. J., Edsall J. T.*, *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Reinhold, New York, 1958.
29. *Tavel P. V., Sigher R.*, *Adv. Protein. Chem.*, **11**, 237 (1956).
30. *Schwenke K. D.*, *Z. Chem.*, **5**, 322 (1965).
31. *Hausmann W., Craig L. C.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2703 (1958).
32. *Strathmann H.*, *Chem. Techn.*, **7**, 333 (1978).
33. *Determann H.*, *Gelchromatographie*, Springer Verlag, Berlin-New-York-Heidelberg, 1967.
34. *Ackers G.-K.*, *Adv. Protein. Chem.*, **24**, 343 (1970).
35. *Friedli H., Kistler P.*, *Chimia*, **26**, 25 (1972).
36. *Fischer L.*, *An Introduction to Gel Chromatography*, Elsevier, North-Holland, New York, 1972.
37. *Curling J.*, *Int. Lab.*, **1976**, 37.
38. *Galpin I. J. et al.*, *J. Chromatogr.*, **106**, 125 (1975).

39. *Gordon A. H.*, Electrophoresis of Proteins on Polyacrylamid and Starch Gels, Elsevier, North-Holland, 1971.
40. *Maurer H. R.*, Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 2 Aufl., W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971.
41. *Maurer H. R.*, Disk-Electrophorese, W. de Gruyter, Berlin, 1968.
42. *Radola B. J.*, Biochem. Biophys. Acta, **295**, 412 (1973); **386**, 181 (1974).
43. *Wellner D.*, Electrofocussing in Gels, Anal. Chem., **43**, 597 (1971).
44. *Allen R. C.*, *Maurer H. R.*, Electrophoresis and Isoelectric Focussing in Polyacrylamid Gels, W. de Gruyter, New York, 1974.
45. *Arbuthnot J. P.*, *Beeley J. A.*, Isoelectric Focussing, Butterworths, London, 1975.
46. *Wagner H.*, *Speer W.*, J. Chromatog., **157**, 259 (1978).
47. *Everaerts F. M. et al.*, Isotachophoresis-Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, New York, 1976.
48. *Beckers J. L.*, *Everaerts F. M.*, J. Chromatog., **68**, 207 (1972); **69**, 165.
49. *Backhausz R.*, Immunodiffusion und Immunelektrophorese; Grundlagen, Methoden und Ergebnisse, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967.
50. *Clausen J.*, Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, Elsevier, North-Holland, New York, 1971.
51. *Grabar P.*, *Burtin P.*, Immunelektrophoretische Analyse, Elsevier, North-Holland, 1964.
52. *Shung-Ho Chang et al.*, Anal. Chem., **48**, 1839 (1976).
53. *Dozy A. M.*, *Huisman T. H. J.*, J. Chromatog., **40**, 62 (1969).
54. *Axén R. et al.*, Nature, **214**, 1302 (1967).
55. *Cuatrecasas P. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61**, 636 (1968).
56. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
57. *Cuatrecasas P.*, Nature, **228**, 1327 (1970).
58. *Cuatrecasas P.*, *Parikh I.*, Biochemistry, **11**, 2291 (1972).
59. *Cuatrecasas P.*, Adv. Enzymol., **36**, 29 (1972).
60. *Porath J.*, Biochimie, **55**, 943 (1973).
61. *Scouten W. H.*, Int. Lab., **1974**, 13.
62. *Lowry O. et al.*, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
63. *Bradford M. M.*, Anal. Biochem., **72**, 248 (1976).
64. *Tanford C.*, Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York, 1961.
65. *Edsall J. T.*, *Wyman J.*, Biophys. Chemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, 1958.
66. *Tanford G.*, Protein Denaturation, Adv. Protein Chem., **23**, 121 (1968); **24**, 1 (1970).
67. *Svedberg Th.*, *Pedersen K. O.*, The Ultracentrifuge, Oxford, University Press, London, 1940.
68. *Schachmann H. K.*, Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, New York, 1959.
69. *Schachmann H. K.*, Biochemistry, **2**, 887 (1963).
70. *Whitaker J. R.*, Anal. Chem., **35**, 1950 (1963).
71. *Andrews P.*, Biochem. J., **91**, 222 (1964).
72. *Auricchio F.*, *Bruni C. B.*, Biochem. Z., **340**, 321 (1964).
73. *Determann H.*, Gelchromatography, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968.
74. *Swank R. T.*, *Munkres K. D.*, Anal. Biochem., **39**, 462 (1971).
75. *Tanford C.*, Adv. Protein Chem., **23**, 122 (1968).
76. *Reynolds J. A.*, *Tanford C.*, J. Biol. Chem., **245**, 5161 (1970).
77. *Frenkel M. J.*, *Blagrove.*, J. Chromatog., **111**, 397 (1975).

78. *Dickerson R. E., Geis I.*, Funktion und Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1971.
79. *Fasold H.*, Die Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
80. *Hess G. P., Rupley J. A.*, Structure and Function of Proteins, Ann. Rev. Biochem., **40**, 1013 (1971).
81. *Schulz G. E.*, Angew. Chem., **89**, 24 (1977).
82. *Kirschenbaum D. M.*, Anal. Biochem., **53**, 223 (1973); **56**, 208 (1974); **61**, 567; **66**, 123, 303 (1975); **83**, 521 (1977).
83. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1969 u. ff.
84. *Hill R. L.* Adv. Protein Chem., **20**, 37 (1965).
85. *Toi K. et al.*, J. Biol. Chem., **242**, 1036 (1967).
86. *Brown J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 59 (1963).
87. *Witkop B.*, Adv. Protein Chem., **16**, 221 (1961).
88. *Witkop B.*, Science, **162**, 318 (1968).
89. *Gross E., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1510 (1961).
90. *Stark G. R.*, J. Biol. Chem., **248**, 6583 (1973).
91. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1 (1974).
92. *Edman P.*, Mol. Biol. Biochem. Biophys., **8**, 211 (1970).
93. *Blackburn S.*, Protein Sequence Determination Methods and Techniques, M. Dekker, New York, 1970.
94. *Groft L. R.*, Handbook of Protein Sequences, Suppl. A, Joynson — Bruvers, Oxford, 1974.
95. *Bridgen J.*, Sci. Tool., **24**, 1 (1977).
96. *Tsernoglou D. et al.*, Biochem. Biophys. Acta, **491**, 605 (1977).
97. *Sanger F.*, Biochem. J., **39**, 507 (1945).
98. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 59 (1963).
99. *Akabori S. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 507 (1956).
100. *Edman P.*, Acta Chem. Scand., **4**, 277 (1950).
101. *Downing M. R., Mann K. G.*, Anal. Biochem., **74**, 298 (1976).
102. *Frank G., Strubert W.*, Chromatographia, **6**, 522 (1973).
103. *Zeeuws R., Strosberg A. D.*, FEBS Letters, **85**, 68 (1978).
104. *Fairwell T., Barness U. T., Lovins R. F.*, Biochemistry, **9**, 2260 (1970).
105. *Hagenmair H. et al.*, Z. Naturforsch., **256**, 681 (1970).
106. *Sun T., Lovins R. E.*, Anal. Biochem., **45**, 176 (1972).
107. *Creaser E. H., Bentley K. W.*, Biochem. J., **153**, 607 (1976).
108. *Gray W. R.*, Methods in Enzymology, Vol.11, pp.139, 469, Academic Press, New York, 1967.
109. *Gray W. R., Smith J.*, Anal. Biochem., **33**, 36 (1970).
110. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 379 (1963).
111. *Lequin R. M., Niall H. D.*, Biochem. Biophys. Acta, **257**, 76 (1972).
112. *Edman P., Begg C.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80 (1967).
113. *Edman P.*, Protein Sequence Determination (S. B. Needleman, Ed.), Springer-Verlag, New York, 1970.
114. *Braunitzer G. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 867 (1973).
115. *Braunitzer G. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 1563 (1973).
116. *Kleinschmidt T., Braunitzer G.*, Annalen, **1978**, 1060.
117. *Laursen R. A., Bonner A. G.*, Chem. Engng. News., **48**, 52 (1970).
118. *Laursen R. A.*, Eur. J. Biochem., **20**, 89 (1971).
119. *Schellenberger A. et al.*, Z. Chem., **12**, 63 (1972).
120. *Mech C., Jeschkeit H., Schellenberger A.*, Eur. J. Biochem., **66**, 133 (1976).

121. *Laursen R. A. et al.*, FEBS Letters, **21**, 67 (1972).
122. *Previero A. et al.*, FEBS Letters, **33**, 135 (1973).
123. *How-Ming Lee, Riordan J. F.*, Anal. Biochem., **89**, 136 (1978).
124. *Herbrink P. et al.*, FEBS Letters, **60**, 313 (1975).
125. *Niall H. D. et al.*, FEBS Letters, **41**, 62 (1974).
126. *Wachter E. et al.*, FEBS Letters, **35**, 97 (1973).
127. *Loudon G. M., Parham M. E.*, Tetrahedron Letters, **5**, 437 (1978).
128. *Stark G. R.*, Meth. Enzymol., **25**, 369 (1972).
129. *Rangarajan M., Darbre A.*, Biochem. J., **157**, 307 (1976).
130. *Deyl Z.*, J. Chromatog., **127**, 91 (1976).
131. *Lindley H.*, Biochem. J., **126**, 683 (1972).
132. *Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A.*, FEBS Letters, **21**, 200 (1972).
133. *Callahan P. X. et al.*, Fed. Proc., **31**, 1105 (1972).
134. *Sheinblatt M.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 2597 (1966).
135. *Heyns K., Grützmacher H. F.*, Fortschr. Chem. Forschg., **6**, 536 (1966).
136. *Biemann K. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 2845 (1966).
137. *Schier G. M. et al.*, Biomed. Mass. Spectrom., **3**, 32 (1976).
138. *Kelly J. A., Biemann K.*, Biomed. Mass. Spectrom., **2**, 326 (1975).
139. *Nau H.*, Angew. Chem., **88**, 74 (1976).
140. *Nau H., Biemann K.*, Anal. Biochem., **73**, 139 (1976).
141. *Kendrew J. C.*, The Three-Dimensional Structure of the Protein Molecule, Sci. Am., **205**, 96 (1961).
142. *Anfinsen C. B.*, Angew. Chem., **85**, 1065 (1973).
143. *Levinthal C.*, Sci. Am., **214**, 42 (1966).
144. *Tanaka Seiji, Scheraga H. A.*, Macromolecules, **10**, 291 (1977).
145. *Baldwin R. L.*, Ann. Rev. Biochem., **44**, 453 (1975).
146. *Tanaka Seiji, Scheraga H. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 3802 (1975).
147. *Wetlaufer D. B., Ristow S.*, Ann. Rev. Biochem., **42**, 135 (1973).
148. *Ramachandran G. N., Sasisikharan V.*, Adv. Protein Chem., **23**, 282 (1968).
149. *Venkatachalan C. M., Ramachandran G. N.*, Ann. Rev. Biochem., **38**, 45 (1969).
150. *Pauling L. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 205 (1951).
151. *Pauling L., Corey R. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 735 (1951).
152. *Perutz M. F.*, Nature., **1951**, 1053.
153. *Lippert J. L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **98**, 7075 (1976).
154. *Levitt M., Green J.*, J. Mol. Biol., **114**, 181 (1977).
155. *Chothia C. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4130 (1977).
156. *Davies K.*, Educ. Chem., **13**, 71 (1976).
157. *Neves D. E., Scott R. A.*, Macromolecules, **10**, 339 (1977).
158. *Teramoto A., Fujita H.*, J. Macromol. Sci.; Rev. Macromol. Chem. C **15** (2), 165 (1976).
159. *Holmes K. C., Blow D. M.*, The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure, Wiley, New York, 1966.
160. *Fruberg S.*, Naturw. Rundsch., **20**, 185 (1967).
161. *Hoppe W.*, Naturwiss., **55**, 65 (1968).
162. *Hoppe W. et al.*, Naturwiss., **55**, 333 (1968).
163. *Schulz G. E.*, Nachr. Chem. Techn., **22**, 20 (1974).
165. *Hagler A. T., Honig B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 554 (1978).
166. *Schulz G. E. et al.*, Nature, **250**, 140 (1974).
167. *Wetlaufer D. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 697 (1973).
168. *Schulz G. E., Schirmer R. H.*, Nature, **250**, 142 (1974).
169. *Wüthrich K.*, Chimia, **24**, 409 (1970).

170. *Bovey F. A.*, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Academic Press, New York, 1969.
171. *Jirgensons B.*, Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules, 2 Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972.
172. *Beyschok S.*, Science, **154**, 1288 (1966).
173. *Klotz I. M. et al.*, Ann. Rev. Biochem., **39**, 25 (1970).
174. *Darnall D. W., Klotz I. M.*, Arch. Biochem. Biophys., **166**, 651 (1975).
175. *Jaenicke R.*, Naturwiss., **65**, 569 (1978).
176. *Campbell P. N., Sargent J. R.*, Techniques in Protein Biosynthesis, Academic Press, New York, 1967.
177. *Träger L.*, Einführung in die Molekularbiologie, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1969.
178. *Lucas-Lenard J., Lipmann F.*, Ann. Rev. Biochem., **40**, 409 (1971).
179. *Holler E.*, Angew. Chem., **90**, 682 (1978).
180. *Zachau H. G.*, Angew. Chem., **81**, 645 (1969).
181. *Holley R. W.*, Angew. Chem., **81**, 1039 (1969).
182. *Rich A., Rajhandary U. L.*, Ann. Rev. Biochem., **45**, 805 (1976).
183. *Kim S. H.*, Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **17**, 181 (1976).
184. *Rich A.*, Biochemie, **56**, 1441 (1974).
185. *Shoemaker H. J. P., Schimmel P. R.*, J. Biol. Chem., **251**, 6823 (1976).
186. *Eldred E. W., Schimmel P. R.*, J. Biol. Chem., **247**, 2961 (1972).
187. *Igloi G. L. et al.*, Biochemistry, **16**, 1696 (1977).
188. *Haar F.*, Naturwiss., **63**, 519 (1976).
189. *Wittmann G., Jokusch H.*, Molekularbiologie-Bausteine des Lebendigen (Th. Wieland, G. Pfeleiderer, Eds.), p.49, Umschau-Verlag, Frankfurt/M., 1967.
190. *Ochoa S.*, Naturwiss. Rundsch., **19**, 483 (1968).
191. *Mirenberg M.*, Angew. Chem., **81**, 1017 (1969).
192. *Khorana H. G.*, Angew. Chem., **81**, 1027 (1969).
193. *Ochoa S.*, Naturwiss., **55**, 506 (1968).
194. *Smith A. E., Marcker K. A.*, Nature, **226**, 607 (1970).
195. *Blobel G.*, 11th FEBBS Meeting, Kopenhagen, 1977.
196. *Zwilling R.*, Umschau, **78**, 170 (1978).
197. *Chan S. J. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1964 (1976).
198. *Kemper B. et al.*, Biochemistry, **15**, 15 (1976).
199. *Maurer R. S. et al.*, Biochem. J., **161**, 189 (1977).
200. *Wallenfels K., Weil R.*, см.[189], стр.67.
201. *Jacob F., Monod J.*, J. Mol. Biol., **3**, 318 (1961).
202. *Barman T. E.*, Enzyme Handbook, Vol. I, II, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1969.
203. *Betz A.*, Enzyme — Gewinnung, Analyse, Regulation, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
204. *Jencks W. P.*, Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill, New York, 1969.
205. *Blow D. M., Seitz T. A.*, Ann. Rev. Biochem., **39**, 63 (1970).
206. *Bell R. M., Koshland D. E.*, Science, **172**, 1253 (1971).
207. *Kirsch J.*, Ann. Rev. Biochem., **42**, 205 (1973).
208. *Lienhard G. E.*, Science, **180**, 149 (1973).
209. *Page M. I.*, Angew. Chem., **89**, 456 (1977).
210. *Richter O.*, Umschau, **1976**, 581.
211. *Jaenicke R.*, Naturwiss., **65**, 569 (1978).
212. *Gutfreund H.*, Enzymes: Physical Principles, Wiley, New York, 1972.

213. *Koshland D. E.* in: *the Enzymes*, 3 ed., Vol. 1. p. 341, Academic Press, New York, 1970.
214. *Koshland D. E.*, *Sci. Am.*, **229**, 52 (1973).
215. *Monod J. et al.*, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
216. *Richards F. M.*, *Structure and Activity of Ribonuclease*, in: *Structure and Activity of Enzymes*, Academic Press., London, 1964.
217. *Smyth D. G., Stein W. H., Moore S.*, *J. Biol. Chem.*, **238**, 227 (1963).
218. *Kartha G. et al.*, *Nature*, **213**, 862 (1967); *ibid.*, **214**, 234 (1967).
219. *Richards F. M.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 162 (1958).
220. *Wyckoff H. M. et al.*, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3984 (1967).
221. *Wyckoff H. M. et al.*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 305 (1970).
222. *Scoffone E. et al.*, *Chem. Commun.*, **1967**, 1273.
223. *Canfield R. E., Liu A. K.*, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997 (1965).
224. *Blake C. C. F. et al.*, *Nature*, **206**, 757 (1965).
225. *Johnson L. N., Phillips D. C.*, *Nature*, **206**, 762 (1965).
226. *Sigler B. P. et al.*, *J. Mol. Biol.*, **35**, 143 (1968).
227. *Blow D. M. et al.*, *Nature*, **221**, 337 (1969); **225**, 802, 811.
228. *Lipscomb W. N. et al.*, *J. Mol. Biol.*, **19**, 423 (1966).
229. *Quioco F. A., Lipscomb W. N.*, *Adv. Protein Chem.*, **25**, 1 (1971).
230. *Lipscomb W. N.*, *International Congress of Biochemistry, Abstracts* 128, 1970.
231. *Kendrew J. C. et al.*, *Nature*, **185**, 422 (1960).
232. *Edmundson A. E.*, *Nature*, **205**, 883 (1965).
233. *Dickerson R. E.* in: *The Proteins* (H. Neurath, Ed.), Vol. 2, p.603, Academic Press, New York, 1964.
234. *Antonini E., Brunori M.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 977 (1970).
235. *Buse G.*, *Angew. Chem.*, **83**, 735 (1971).
236. *Braunitzer G.*, *Naturwiss.*, **54**, 407 (1967).
237. *Perutz M. F. et al.*, *Nature*, **185**, 416 (1960).
238. *Cullis A. F. et al.*, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **265**, 161 (1961).
239. *Sund H., Weber K.*, *Angew. Chem.*, **78**, 217 (1966).
240. *Fermi G.*, *J. Mol. Biol.*, **97**, 237 (1975).
241. *Huber R. et al.*, *Naturwiss.*, **56**, 262 (1969).
242. *Bradbury J. H.*, *Adv. Protein Chem.*, **27**, 111 (1973).
243. *Rich A., Crick F. H.*, *J. Mol. Biol.*, **3**, 483 (1961).
244. *Grassmann W.*, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoff*, **23**, 196 (1965).
245. *Nemetschek Th.*, *Chem. Labor Betrieb*, **20**, 433 (1969).
246. *Reich G.*, *Kollagen. Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung*, Theodor Steinkopff-Verlag. Dresden, 1967.
247. *Traub W., Piez K. A.*, *Adv. Protein Chem.*, **25**, 243 (1971).
248. *Kühn K.*, *Naturwiss.*, **54**, 101 (1967).
249. *Kabat E. A.*, *Einführung in die Immunochemie und Immunologie*, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1971.
250. *Edelmann G. M., Gall W. E.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 425 (1969).
251. *Kleine T. O.*, *Z. Klin. Chem.*, **7**, 313 (1969).
252. *Sela M.*, *Science*, **166**, 1365 (1969).
253. *ABC Biochemie*, S. 290, VEB Brockhaus Verlag, Leipzig, 1976.
254. *Hiltschmann N.*, *Nova Acta Leopoldina*, **39/1**, 15 (1973).
255. *Kabat E. A.*, *Adv. Protein Chem.*, **32**, 1 (1978).
256. *Derynck R. et al.*, *Nature*, **285**, No5766, 542 (1980).
257. *Taniguchi T. et al.*, *Gene*, **10**, 11, 15 (1980).
258. *Taniguchi T. et al.*, *Nature*, **285**, 547, 549 (1980).

Предметный указатель

- Агматин 72
1-(1-Адамантил)-1-метилэтоксикарбо-
нильная группа 109
Аденозилгомоцистеин 71
Аденозилметнионин 70
Адренкортикотропный гормон *см.*
Кортикотропин
Азетидин-2-карбоновая кислота 22
Азидный метод 99, 138—141, 172, 178
Азлактонный синтез 43
Азлактоны 43, 44, 170—172
Акромегалия 244, 260
АКТГ *см.* Кортикотропин
Активированные эфиры 146 и сл.
— полимеры 198, 199, 200
Актин 340
Актиномицины 201, 299 и сл., 398
Аламетицин 305, 306
Аланин 14, 17, 20, 27, 28
— абсолютная конфигурация 26
— биосинтез 50
— ИК-спектроскопия 35
— молекулярное вращение 23, 24
— наличие 20, 48
— пространственное расположение 26
 β -Аланин 20, 155
DL-Аланин, изопропиловый эфир 52
Алафосфин 298
Алитензин 89, 236, 284
2-Алкоксноксазолонь 172
Алкогольдегидрогеназа 387
N-Алкиламинокислоты 11
Алкилирование шиффовых оснований 44
N-Алкилтио-тиокарбониламинокислоты
29
Аллиин 21
Альбумины 340, 343, 345, 355, 357
 α -Аманитин 299, 311
Аматоксин 299, 309 и сл.
Амелетин 289
Амидазы 400
1-Амидино-3,5-диметилпиразол 128
Амидирование 128
трет-Амилоксикарбонильная группа 108
Аминоадипиновая кислота 11, 23
 δ -Аминоадипилцистеинилвалин 232
L-2-Амино-4-(4'-амино-2', 5'-циклогекса-
денил)масляная кислота 21, 22
Аминоацилсвязывающее место 394 и сл.
Аминоацил-тРНК-синтетаза 388, 389
Аминоацильная перегруппировка 164 и
сл.
6-Аминогексановая кислота 9, 32
Аминозащитные группы 101 и сл.
 α -Аминокарбоновых кислот нитрилы 42
 α -Аминокапролактam 41
L-Аминокапролактама гидролаза 41
 α -Аминокапролактама рацемизация 41
 ϵ -Аминокапроновая кислота *см.* 6-Ами-
ногексановая кислота
Аминокислоты 9 и сл.
— абиогенное образование 48, 49
— абсолютная конфигурация 26
— алкилирование 70
— амфотерность 30
— анализ 55 и сл.
— антагонисты 20, 22
— асимметрический синтез 47 и сл.
— ацилирование 71
— биосинтез 49 и сл.
— вкусовые качества 29
— выделение из белковых гидролизатов
38, 39
— групповое разделение 39
— изоэлектрические точки 32
— комплексобразование с металлами
67
— конфигурация 25
— константы диссоциации, pK 31, 32
— кривые титрования 31

- микробиологический синтез 39
- молекулярное вращение 23, 24
- незаменимые 18
- непотенногенные 20, 232
- номенклатура 10, 11
- получение 38
- — меченых 45 и сл.
- пребиотический синтез 48
- пространственная модель 26
- протениногенные 17 и сл.
- разделение рацематов 51, 52
- растворимость 30
- рацемизация 51 и сл.
- D-соединения 9, 23
- сокращения 12, 13
- спектры ДОВ 24, 25
- — ИК 35—36
- — КД 24—26
- — УФ 35
- — ЯМР 35 и сл.
- стереохимия 20 и сл.
- стерическая корреляция 27
- температуры разложения 33
- удельное вращение 23, 24
- эфиры 39, 73
- Аминокислотный компонент 95, 96
- Аминолиз эфиров 147 и сл.
- Аминомасляная кислота 9, 11
- L-2-Амино-4-(метилфосфино)масляная кислота 22
- Аминопропионовая кислота 9
- α -Амино-3-хлор-2-изоксалин-5-уксусная кислота 21
- 1-Аминоциклопропанкарбоновая кислота 20
- Анализ аминокислотной последовательности 65, 367 и сл.
- Аналитические автоматы 56, 59, 60
- Ангиотензин 234, 278 и сл.
- Ангиотензин II 89, 168, 194, 229, 240, 278
- Андерсона—Каллахана тест 175
- Антамид 194, 305, 309, 312
- Антиген—антитело реакция 240, 424
- Апамин 313, 314
- Апоферритин 420
- Аргинин 10, 15, 17, 18, 34, 96, 125
- Аргининдекарбоксилаза 387
- Аспарагин 10, 11, 16, 17, 121, 188
- биосинтез 50
- наличие 16
- расщепление рацемата 53
- Аспаргинил 11
- Аспарагиновая кислота 15, 17, 96, 188, 210
- биосинтез 50
- декарбоксилирование 71
- применение 38
- проекция Ньюмена 29
- семиальдегид 40
- ферментативный синтез 40
- ЯМР-спектры 36, 37
- L-Аспартаза 41
- Аспартаткиназа 387
- Аспартил 11
- Аспартоцин 249
- Аспрохацин 316
- Аффинная хроматография 353, 354
- Ацетамидометильная группа 135, 205
- N-Ацетилимидазол 191
- Ацетиллизин 12
- Ацетоацетильная группа 110
- Ацетуровая кислота 43
- N-Ациламинокислоты 55, 71, 102
- анилиды 54
- фенилгидразида 54
- Ацилмочевина 153 и сл., 158
- Ацилпереносящий белок 194
- Бассианолид 317
- Бейтса реагент 161
- Бацитрацин 232, 298
- Беауверин 304
- Белки 340 и сл.
- амфолитный характер 356
- анализ аминокислотной последовательности 367 и сл.
- антифризы 429, 430
- бактерий 343
- Бенса—Джонса 426, 427
- биологическая значимость 19
- биосинтез 341, 388 и сл.
- — корректирующий механизм 391
- буферное действие 357
- водорослей 343
- выделение 343, 345 и сл.
- высаливание 358
- гидратация 358
- гидролиз 38, 39
- глобулярные 344, 364
- денатурация 358 и сл.
- изoelekтpические точки 356, 357

- классификация 344 и сл.
- количественное определение 355, 356
- конформация 364
- — скелета 383
- критерий чистоты 354
- листьев 342
- методы фракционирования 346 и сл.
- микробиологический синтез 341, 342
- молекулярные массы 359 и сл.
- незаменимых аминокислот содержание 19
- обнаружения реакции 355
- одноклеточных 341, 342
- определение концевых групп 367 и сл.
- — пространственной структуры 383 и сл.
- плазмы 344, 353
- резервные 340, 344, 412 и сл.
- рентгеноструктурный анализ 383, 384
- структура вторичная и третичная 374 и сл.
- — первичная 364 и сл.
- — четвертичная 363, 386 и сл.
- субъединицы 387
- фибриллярные 345
- Белковый сквенатор 370 и сл.
- Бензгидриловые эфиры *см.* Дифенилметилловые эфиры
- Бензилоксалол-5-метиленоксикарбонильная группа 109
- Бензильная группа 113, 128, 129, 132, 135, 187, 193
- Бензил-(4-нитрофенил)карбонат 151
- Бензиловые эфиры 117, 118
- Бензилоксикарбониларгинин гидробромид 127
- Бензилоксикарбониласпарагиновая кислота- β -бензиловый эфир 37
- — α -бензиловый- β -*трет*-бутиловый эфир 12
- Бензилоксикарбонил-S-бензилцистеин 4-нитрофениловый эфир 174
- 1-Бензилоксикарбониламино-2,2,2-трифторэтильная группа 129, 132
- Бензилоксикарбонильная группа 100, 102 и сл., 107, 114, 124, 129 и сл., 187, 223
- Бензилсульфонильная группа 110
- O-Бензилтреонин 133
- 1-Бензил-3-этилкарбодимид 155
- S-Бензилцистеин 12
- Бензоильная группа 99, 112
- Бензотриазолилокситрис-(диметиламино)фосфонийгексафторфосфат 161
- Бергера*—*Шехтера*—*Босхарда* тест 177
- Бетаины 70
- «Бессмысленные» кодоны 392
- «Биг»-гастрин 94, 276, 277
- Биогенные амины 72 и сл.
- 1,2-Бисацилгидразины 140
- Бис-L-гистидината никеля(II) гидрат 68
- Бисглицината меди(II) гидрат 68
- Бис-D,L-пролината меди(II) дигидрат 68
- Биуретовая реакция 355
- 2-[Бифенилил-(4)]пропил-2-оксикарбонильная группа 106, 109
- Бодански* тест 176
- Бомбезин 89, 236, 282 и сл.
- Бомбинин 315
- Боотрис(трифторацетат) 126, 188, 193
- Брадикинин 94, 190, 194, 281, 284 и сл.
- 5-Бром-7-нитроиндолинильная группа 163
- Бунгаротоксин 221, 226, 316
- трет*-Бутил-5-[4,6-диметилпиримидил-2-тио]карбонат 105
- трет*-Бутил-(4-нитрофенил)карбонат 151
- трет*-Бутиловые эфиры 118, 120
- трет*-Бутилоксикарбонилазид 105
- трет*-Бутилоксикарбонильная группа 104—106, 108, 114, 124, 129, 131, 187, 188
- трет*-Бутилтиольная группа 134, 135
- трет*-Бутильная группа 112, 132, 193
- Бумажная хроматография 57
- Бухерера* синтез 42
- Вазопрессин 89, 91, 93, 94, 204, 222, 229, 238, 247 и сл., 286
- Вазотоцин 249, 250
- Валин 11, 13, 14, 17
- биосинтез 50
- проекции *Ньюмена* 29
- *трет*-бутиламид 64
- Валиномицин 208, 303 и сл., 305
- Валитоцин 249, 250
- Вейганда* тест 176
- Вещество А 297
- Вещество Р 94, 194, 233, 238, 255, 279 и сл., 281, 282, 286, 287
- Вилкинсона* комплексный катализатор 47
- Виниловые эфиры 149
- Виомицин 302

- Вирусные белки 344
 Вицилин 426
 Вторичная структура 363, 364, 374 и сл.
 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) 60, 226
- Габриеля* синтез 42
 Газовая хроматография 55, 61
 — разделение энантиомеров 62, 63
 — получение производных 61
 α -Галогенкарбонových кислот хлорангидриды 99, 105*
- Галперн*—*Вайнштейна* тест 176
 Гастрин 89, 94, 239, 260, 273, 275 и сл., 278, 286
 Гель-фильтрация 349, 361, 388
 Гель-хроматография 349
 — коммерчески доступные гели 350
 Гель-электрофорез 351
 Гемоглобин 344, 387, 415 и сл.
 — первичная структура 417
 — пространственная модель 418
 — связывание кислорода 416
 Гемозидерин 420
Гендерсона—*Хассельбалха* уравнение 32
 Генетический код 17, 392
 Генная технология 244, 261, 270
 Ген-оператор 397
 N-Гептафторбутирилпропиловые эфиры аминокислот 61, 62
 Гетерополиаминокислоты 209
 Гидантоны 44, 73, 74
 Гидроксиацильная перегруппировка 206
 1-Гидроксибензотриазол 128, 156
 Гидроксибензотриазоловые эфиры 150
 N-Гидроксиглутарилмидные эфиры 150
 2-Гидроксиимино-2-циануксусной кислоты этиловый эфир 156
 Гидроксилазы 400
 Гидроксилизин 11, 19
 N-Гидроксиморфолиновые эфиры 150
 Гидроксиметиламинокислоты 32
 N-Гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимид 150, 156
 — эфир 150
 3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин 156
 3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин 157
 — эфир 150
- N-Гидроксипиперидиновые эфиры 147, 149, 173
 3-Гидроксипиридазон-6, эфир 150
 N-Гидроксипиримидин-2,3-карбоксимидные эфиры 150
 Гидроксипролин 11, 19, 131, 423, 424
 — алло-модификация 27
 N-Гидрокси-сукцинимидные эфиры 113, 127, 149, 151
 N-Гидроксиуретановые эфиры 150
 2-Гидроксифениловые эфиры 150
 N-Гидроксифталимидные эфиры 150
 2-Гидрокси-3-этиламинокарбонилфениловые эфиры 150
 7-Гидрокси-2-этил-(бензо-1,2-оксазолий)тетрафторборат 173
 2-Гидроксиэтилсульфонилметильный носитель 186
 Гидролазы 166, 400
 Гидрофобные взаимодействия 383
 Гипафорин 70
 Гипоталамуса гормоны 89, 252 и сл.
 Гиппуровая кислота 43, 98, 99, 141, 166
 Гистамин 72
 Гистидин 15, 17, 18, 96, 129, 221
 Гнетоны 345
 Глиадин 240
 Гликоаминокислоты 75
 Гликопротеины 75, 345
 Гликозидазы 400
 Глицилглицин 92, 99
 Глицин 14, 17, 99, 154, 172, 233
 — биосинтез 50
 — вкусовые качества 29
 — кривая титрования 31
 — наличие 48, 421
 — этиловый эфир 12
 Глобулины 353
 Глутамитоцин 249, 250
 Глутамат натрия (моно) 29, 38, 43
 Глутамил 11
 Глутамин 10, 11, 16, 121, 188, 217
 — биосинтез 50
 — номенклатура 11
 — расщепление 17
 Глутаминил 11
 Глутаминовая кислота 10, 11, 16, 17, 85, 187, 210
 — биосинтез 42
 — выделение 39
 — применение 41

- микробиологический синтез 41
- кривая титрования 31
- *Штрекера* синтез 43
- Глутаминсинтетаза 387
- Глутатион 86, 87, 100, 231
- Глюкагон 89, 94, 194, 221, 226, 239, 259, 260, 270 и сл.
- Гомополиаминокислоты 209
- Гомосерин 21, 40
- Гомосериндегидрогеназа 40
- Гомоцистеин 21
- Гонадолиберин 156, 229, 253, 254, 257, 260, 288
- Гонадотропин 235
- Гонадотропина релизинг-гормон см. Гонадолиберин
- Гормон роста 93, 193, 194, 204, 214, 243 и сл., 254, 260, 280
- Гормоны тканей 89
- Грамицидин S 306

- Дансиламинокислоты 29
- Дансильный метод 51, 367
- Дегидроаланин 183, 297
- Дегидрогеназы 400
- Дезаминирование 69
- Дезмозин 19, 421
- Декстрановые гели 349
- Денатурация 358 и сл.
- Депсипептиды 204
- Деструксины 317
- Диабет 249, 252, 260, 262
- Диагональный электрофорез 365, 366
- Диазоуксусный эфир 69
- Диализ 349
- Диаминоасляная кислота 11, 21
- Диаминопимеллиновая кислота 23
- Диаминпропионовая кислота 21
- 1-*транс*-2,3-Дикарбоксиазириндин 22
- 4-N,N-Диметиламиноазобензил-4-изо-тиоцианат 370
- α,α -Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная группа 104
- 5,5-Диметил-3-оксоциклогексен-1-ильная группа 114
- N,N-Диметилтриптамин 72
- 3,5-Диметоксибензилоксикарбонильная группа 104
- 2,4-Динитрофениловые эфиры 132, 149
- 3,4-Диоксифенилаланин см. ДОФА
- Диоксопиперазины 74, 84, 99, 203, 211
- Дипептидиламинопептидаза I 373
- Дипиридил-2-дисульфид 160
- Диск-электрофорез 351
- Дисульфидная связь 87, 88, 204
- — расщепление 364
- Дитиосуцциноильная группа 185
- Ди-*трет*-бутилкарбонат 105
- Дифенилметилловые эфиры 119
- Дифенилметильная группа 121, 122, 129, 132, 135, 205
- 4,6-Дифенилтиено[3,4-*d*][1,3]диоксол-2-он-5,5-диоксид 148
- Дифенилтиофосфонильная группа 115
- 2,4-Дихлорбензилоксикарбонильная группа 107
- 5,7-Дихлор-8-оксихинолин 156
- 1,3-Дициклогексил-2,4-бис-(циклогексалимино)1,3-диазетидин 157
- N,N-Дизтилтриптамин 72
- Домены 364
- ДОФА 20, 47
- Дофамин 72

- Желатина 424

- Защитные группы 96, 100 и сл.
- — амидных функций 115 и сл.
- — аминных функций 101—115
- — временные 96
- — карбоксильных функций 115 и сл.
- — отщепление и стабильность 107—110, 223, 224
- — постоянные 96
- Зизифии 319

- Изоаспарагин 12
- Изоборнилоксикарбонильная группа 109
- Изобутириламидометильная группа 135
- 1-Изобутилоксикарбонил-2-изобутилокс-1,2-дигидрохинолин (ИИДХ) 143
- Изодезмозин 19, 421
- алло*-Изолейцин 11, 27, 176
- Изолейцин 14, 17
- микробиологический синтез 40
- эпимеризация 52
- Изомеразы 401
- Изомочевина 152
- Изоникотинилоксикарбонильная группа 108
- Изонитрозомалоонитрил 156
- Изопептидная связь 86
- Изотахофорез 351

- Изотопного разбавления метод 66
 Изотоции, 249, 250
 5-(О-Изоурендо)-L-норвалин 22
 Изозлектрическая точка 32, 351
 Изозлектрическое фокусирование 351
Изумия тест 176
 α -(2-Иминогексагидро-4-пиримидил)глицин 21
 Иминодинитрилы 42
 Иминокислоты 15
 Иммуный ответ 424 и сл.
 Иммуноглобулины 340, 364, 424 и сл.
 Иммуноэлектрофорез 352
 Ингибиторы ферментов 399
 Индуктор 397
 Инициации факторы 394
 Инсулин 87, 89, 100, 194, 205, 206, 214, 217, 218, 222, 234, 239, 260, 262 и сл., 286, 343
 Интергерренин 319
 Интергеррессин 319
 Интерколяция 398
 Интерфероны 340, 430 и сл.
 2-Иодэтоксикарбонильная группа 108
 Ионообменная хроматография 59 и сл., 352
- Кадаверин 72
 Казени 340
 β -Казоморфин 291
 Каллидин 281
 Калликрени 281
 Канаванин 22
 Капреомицин 302
 Карбоаналоги 250
 Кальцитонин 239, 273 и сл.
 Карбоангидраза В 219
 Карбодиямидный метод 138, 153 и сл.
 N-Карбоксиангидриды 74, 141, 144, 145
 α , γ -Карбоксиглутаминовая кислота 23
 Карбоксикомпонент 95, 96
 Карбоксипептидазы 169, 368, 372, 380, 410 и сл.
 N,N-Карбонилдиямидазол 186
 Карбэтоксигруппа 100, 102
 Кардиотоксины 315
 Карнозин 100, 286
 Кассинин 236, 282, 283
 Катал 399
 Каталаза 387
 Катализаторы рутенийфосфиновые 47
- Катепсин 211
Кемпа тест 142, 176
 Кератины 378, 420 и сл.
 Кинины плазмы 281
 Киоторфин 286, 291
 Клеверного листа структура 389 и сл.
 Кобротоксин 194, 315
 Коламин 72
 Колистин 308
 Коллагены 357, 422 и сл.
 Комплекс фермент — продукт 398
 — фермент — субстрат 398
 Конденсации методы 137 и сл.
 Конканавалин А 387, 429
 Константа катализа 399
 Конформационный анализ 30, 384, 385
 Конформации стабилизация 381
 Кормовые белки 19, 341
 Кортикотропин 89, 93, 94, 156, 194, 215, 226, 227, 229, 230, 234, 237, 240 и сл., 245, 246, 260, 273, 286, 287
 Кортиколиберин 253, 254
Коттона эффект 24, 29, 385
 Креатин 71
 Ксантопротеиновая реакция 355
Курицуса перегруппировка 140
- β -Лактоглобулин 357, 387
 Лантионин 21, 297
Лаури метод 355
 N-Лауроилглутаминовая кислота 71
Льюиса кислоты 158, 174
 Лейкокинин 295
 Лейцин 14, 17, 51
 Лейцинамминопептидаза 177, 368, 373, 387
 Лектины 428, 429
Летсингера синтез 195, 212
 Лиазы 400
 Либерины 253
 Лигазы 401
 Лигандообменная хроматография 63
 Лизин 15, 17, 18, 19, 86, 96, 103, 187, 210
 — биосинтез 50
 — кривые титрования 31
 — микробиологический синтез 39, 40
 — применение 38
 — ферментативный синтез 41
 Лизоцим 194, 219, 226, 344, 348, 351, 378, 380, 404 и сл.
 — активный центр 405 и сл.
 — комплекс с ингибитором 407

- механизм действия 408
- первичная структура 405
- Липопротеины 345
- Липотропин 242, 245 и сл., 286, 291
- Литорин 236
- Люлиберин 156, 253, 254
- Люотропин *см.* Пролактин
- Лютеинизирующий гормон 254, 257, 280
- Лютеотропный гормон *см.* Пролактин
- Лютропин *см.* Лютеинизирующий гормон
- Люцифераза 387

- Макропептиды 84
- Макрофибриллы 421
- Максимальной защиты тактика 221, 222
- Малатдегидрогеназа 387
- Малоновый эфир в синтезе 45 и сл.
- Малформин 313
- Манниха* конденсация 163
- Масс-спектрометрический анализ аминокислот 64, 65
- Мастопаран 315
- Матричная РНК 392 и сл.
- Мезитилен-2-сульфонильная группа 126
- Мезотоцин 249, 250
- Меланолиберин 246, 253, 254, 258
- Меланостатин 246
- Меланотропин *см.* Меланоцитстимулирующий гормон
- Меланотропина рилизинг-гормон *см.* Меланолиберин
- Меланоцитстимулирующий гормон 89, 90, 220, 237, 242, 246 и сл., 258, 260, 286
- Мелатонин 72
- Меллитин 313, 314
- Мембранные белки 344
- Меррифилда* синтез 98, 100, 120, 131, 179 и сл., 214, 215
- Металлокомплексы 67, 353
- Металлопротеины 345, 419, 420
- Метеорит мерчинсонский, присутствие аминокислот 48
- N-Метиламинокислот синтез 47, 70
- 1-Метил-2-бензоилвинильная группа 114
- N-Метилвалин 11
- Метиловые эфиры 104, 117, 118
- Метилсульфонилэтоксикарбонильная группа 108
- 4-Метилсульфонилфениловый эфир 124, 149
- 2-(Метиятио)-этоксикарбонильная группа 115
- Метилтиометильная группа 132
- 4-Метилтиофениловый эфир 124
- α -Метил-2,4,5-триметилбензилоксикарбонильная группа 109
- Метниониллизилбрадикинин 281
- Метнионин 10, 15, 17, 18, 19, 46, 104, 106, 188
- биосинтез 51
- защита 136, 137
- применение 38
- спектры КД 25
- *Штрекера* синтез 43
- Метод
- *Аджиномото* 43
- *Акабори* 368
- активированных эфиров 146—150, 173, 190, 210, 213, 221, 225
- ангидридов 132, 141 и сл.
- — симметричных 143, 144
- — смешанных 112, 123, 138, 141 и сл., 178, 202, 225
- *Бредфорда* 356
- водородо-дейтериевого обмена 385, 386
- *Вюнша—Войганда* 155, 178
- *Гейгера—Кёнига* 156, 178, 217, 269
- двухфазный 213
- дициклогексилкарбодимидный (ДЦГК) 113, 114, 130, 153 и сл., 178, 186, 189, 190, 225
- *Дормана* 190
- ДЦГК с добавками 138, 153 и сл., 174
- *Дюпона* 43
- жидкофазный 195 и сл.
- нзоксазолиевых солей 114, 152
- N-карбоксиянгидридов 144 и сл., 196, 209
- квадрольный 371
- кристаллизации 195, 197
- *Камбера* 134
- *Лаури* 355
- *Митина* 159
- *Мужаймы* 159, 178
- тионилхлоридный 117
- *Уги* 162, 163, 173
- фосфатный 208

- фосфороазо 158
— *Хиски* 134, 205
— хлорангидридный 99, 105, 115, 133, 208
4-Метоксибензиловый эфир 118
4-Метоксибензилкарбонильная группа 104
4-Метоксибензилсульфонильная группа 126
4-Метоксибензиловая группа 121, 122, 135
2-Метокси-4-нитрофениловый эфир 150
4-Метоксифенациловый эфир 118
Механизм индукции — репрессии ферментов 397
Микамицин 302
Микросом белки 344
Микрофибриллы 421
Миллона реакция 355
Минимальной защиты тактика 221, 222
Минифаллотоксин 311
Многоблин 218, 219, 357, 412 и сл.
— пространственная структура 413
— связывание кислорода 414, 415
— электронных плотностей распределение 414
Миозин 340
Михаэлиса — *Ментон* уравнение 398, 399
Модель «site-by-site» 392
Молочная кислота 28
— — молекулярное вращение различных производных 28
Монамицин 308, 309
Мотилин 93, 274, 278
Мышечные белки 344
- Нагароза 167
Налоксон 294
Натрия додецилсульфат 359, 362
Нейропептиды 89, 90, 233, 285 и сл.
Нейротензин 255, 280, 286
Нейротоксины 315, 316
Нейротрансмиттеры 72, 89, 90, 233, 247, 260, 280, 286, 287, 294
Нейтральными солями осаждение 346
Нейрофизины 248, 286
Неокардиостатин 297
 α -Неоэндорфин 293
Нервный ростовой фактор 387
Низин 297
- Нингидриновая реакция 56, 190
3-Нитро-4-аминометилбензоиламидный носитель 185
Нитроаргинин 104, 126
4-Нитробензиловые эфиры 118, 119, 193
Нитробензилкарбонильная группа 104, 127
4-Нитробензолсульфидгидроксамовая кислота 156
6-Нитровератрилоксикарбонильная группа 104, 107
Нитрогены 420
2-Нитро-4-сульфофениловый эфир 149
2-Нитрофениловые эфиры 149
4-Нитрофениловые эфиры 114, 127, 149, 151
2-Нитрофенилтиогруппа 110, 111, 120, 130, 131, 205
2-Нитрофеноксиацетильная группа 110
3-Нитрофталево́й кислоты ангидрид 191
Норвалин 11
Норлейцин 11
Нуклеоаминокислоты 75
Нуклеопротеины 345
- Овальбумин, 340
1,3-Оксазолидиндионы см. N-Карбоксиангидриды
Оксигемоглобин 418
Оксидазы 400
— D-аминокислот 18
Оксидоредуктазы 400
Окситоцин 89, 94, 100, 194, 204, 216, 222, 226, 229, 247 и сл.
Олигомеризация цианидов 48
Оперон 397
Опийные пептиды 90, 289 и сл.
Опийные рецепторы 230, 289, 294
Определение аминокислот по *Ван Слайку* 68
Оптического вращения дисперсия 24, 25, 385
Орнитин 23, 85, 101
- Пандамин 318
Папаин 167, 168, 365
Паратиреоидный гормон-89, 94, 194, 235, 271 и сл.
Пассерини реакция 163, 207

- Паули реакция 355
 Пелликулярная смола 181
 Пельветин 232
 Пенициллин 298
 Пентагастрин 229, 276
 Пентаметилбензиловый эфир 118
 Пентафторфениловые эфиры 149, 152
 Пентафторфенилизотиоцианат 370
 Пентахлорфениловые эфиры 149, 152
 Пепсин 54, 167, 169, 178, 211, 260, 357, 365
 Пептидазы 400
 Пептидилсвязывающее место 394 и сл.
 Пептидилтрансфераза 166, 395
 Пептидная связь 83, 84, 85
 Пептиды 83 и сл.
 — диклические 204 и сл.
 — гетеромерные 87
 — гомодетные 87
 — циклические 83, 90, 201 и сл.
 Пептидный пул 89
 Пептидный синтез 92 и сл.
 — — быстрый 214
 — — в водной среде 196
 — — жидкофазный 195 и сл.
 — — на полимерном носителе 98, 178 и сл.
 — — с полимерными реагентами 199 и сл.
 — — стратегия 98, 211 и сл.
 — — тактика 98, 220 и сл.
 — — ферментативный 166 и сл.
 — — чередующийся твердофазно-жидкофазный 197, 215
 — — «in situ» 213
 Пептидные алкалоиды 318 и сл.
 Пептидные антибиотики 90, 206, 298
 Пептидные гормоны 90, 232 и сл., 236
 Пептидные инсектециды 316 и сл.
 Пептидные лактоны 90, 206
 Пептидные токсины 309 и сл.
 Пептидный синтезатор 191, 192
 Пептоиды 89
 Пептоиды 89, 201, 207
 Первичная структура 86, 358, 363 и сл.
 Переаминирование 69
 Пивалиновая кислота 142
 Пипеквалиновая кислота 22
 Пиперидинкарбонильная группа 129
 Пиперидиноксикарбонильная группа 109
 β -Пиразолилаланин 20, 21
 Пиридилдифенилметильная группа 129, 135
 Пиридил-4-метилловые эфиры 118
 Пиридил-2-тиозфир 150
 Пироглутамилпептиды 121, 231, 232
 Пирролинон 29
 Плазмин 428
 Плазминоген 428
 Пластинная реакция 166, 211
 Полиакриламидный электрофорез 351, 361, 362, 388
 Полнаминоокислоты 209 и сл.
 Полигексаметиленкарбодимид 155
 Полиглутаминовая кислота 210, 378
 Полиизотиоцианат 372
 Полилизин 209, 378
 Полимерный носитель нерастворимый 179 и сл.
 — — растворимый 195 и сл., 200
 Полнимиксинны 21, 307, 308
 Поли[1-оксисбензотриазол]стирол 200
 Полипептиды 84
 Полистескинин 285, 314
 Полиэтиленминовый носитель 196
 Поли(1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин) 200
 Пребиотические конденсирующие реагенты 49
 Пребиотический синтез аминокислот 48
 Прегемоглобин 416
 Препробелки 397
 Препроинсулин 265
 Препролактин 245
 Препромеллитин 313
 Препропаратиреоидный гормон 273
 Пристинамицин I 302
 Проинсулин 226, 263 и сл.
 Проктолин 288
 Пролактин 235, 245, 257, 260
 Пролактина ингибирующий выделение гормон 245, 253, 254, 258
 Пролактолиберин 245, 253, 254, 259
 Проламины 344
 Пролизин 167
 Проллил-гРНК-синтетаза 22
 Пролин 11, 13, 15, 22, 154, 172, 217
 — биосинтез 50
 — прерывание спирали 379
 Промеллитин 313, 314
 Проопиомеланокортин 242, 246
 Пропаноламин 72

- Протеиды 345
 Протеиногенные аминокислоты 17
 Протофибриллы 421
 Псилоцин 72
 Пул аминокислот 10
 Пуромидин 398
 Путресцин 72

 Радиоммунное определение 230, 236, 240
Рамачандрана диаграмма 377
 Ранатензин 89, 236
 Распределение по *Крейгу* 347
 Растворителями осаждение 346, 347
 Расщепление N-бромсукцинимидом 366
 — бромцианом 90, 219, 261, 366
 Рацемизация аминокислот 51
 — в пептидном синтезе 169 и сл.
 — методы определения 175 и сл., 216
 Резилин 420
 Релаксин 239
 Ренатурация 358
 Ренин 279
 Репрессор 397
 Рецепторные белки 340, 344
 РИА см. Радиоммунное определение
 Рибонуклеаза 87, 100, 146, 193, 194, 204, 214, 218, 344, 357, 401 и сл.
 Рибосомы 341, 393 и сл.
 Рилизинг-факторы 230
 Рифамицин 398
 Роданинковый синтез 44
 РНК-полимеразы подавление 398
 тРНК-третичная структура 391
Руггли—Циглера принцип разбавления 201

Сакагучи реакция 355
 Саркозин 21, 48, 84
Сведберга единица 360, 361
 Секретин 89, 94, 213, 226, 270, 274, 277
 Селенофениловый эфир 149
 Семисинтез 169, 218 и сл.
 Серин 10, 14, 17, 90, 104, 132, 133, 141, 187, 221
 — биосинтез 50
 — в фибрине шелка 421
 — стерическая корреляция 27
 — применение 38
 — проекция *Ньюмена* 29
 Серицин 422
 Серотонин 72

 Серратомолид 208, 304
 Сефадекс 349, 350, 352, 361
 Сефароза 350
 Сиалоген 279
 Сигнальная гипотеза 265, 313, 396, 397
 «Сигнальные» пептиды 265, 313, 396
 Сиднонимины 68, 69
 Сидноны 68, 69
 Синтез через гидантоины 44
 Синтегазы 401
 Скотофобин 93, 288
 Скутиамины 319
 Сладкие пептиды 90, 276
 Соматолиберин 244, 253, 254
 Соматомедины 244
 Соматостатин 194, 204, 253, 256 и сл., 288
 Соматостатин-28 259
 Соматотропина рилизинг-гормон см. Соматолиберин
 Соматотропный гормон см. Гормон роста
 Спираль — клубок переход 381
 Спиральные структуры 378 и сл., 383, 385
 Спонтанная кристаллизация 52, 53
 Споридезмолиды 304
 Стабилизирующие спираль аминокислоты 378
 Стадины 253
 Стафилококковая нуклеаза 194, 218, 219
 Стафиломицин S 302
 Стахидрин 70
 N-Стеарилглутаминовая кислота 71
 Стекло как носитель в аффинной хроматографии 354
 Стоп-кодоны 392, 395
 Стрептограмин В 301
 Стрептокиназа 428
 Стрептомицин 398
 Структурные белки 344
 Субтилзин 167, 365, 403
 Субтилин 297
 Сузукациллин А 305
 S-Сульфогруппа 137
 Суперспираль 424
 Сферон 354

 Табачной мозаики вирус 387
 Таурин 233, 286
 Тафидин 295

- Тахикнины 282 и сл.
 Таминаза N 167
 Тентоксин 90
 Терминаторные белки 395
 Термическая конденсация 48, 49
 Термолизин 167, 365
 Тетрагидропиранильная группа 132, 133
 1,3-Тиазолидин-2,5-дион см. N-Тиокар-
 боновой кислоты ангидрид
 Тимозин α_1 295, 296
 Тимопоэтин II 295
 Тиногидантоновый синтез 44
 Тиногидантоны 74
 N-Тиокарбоновой кислоты ангидрид 146,
 213, 221
 Тиоредоксин 218
 Тиофениловые эфиры 114, 147, 149
 Тирамин 72
 Тиролиберин 229, 253, 254 и сл., 260, 288
 Тиреотропин 257, 280
 Тирозин 10, 13, 16, 17
 — выделение 38
 — биосинтез 50
 — УФ-спектр 35
 Тирозил-тРНК-синтетаза 389
 Тирозина бензиловый эфир 133
 — *трет*-бутиловый эфир 133
 Тироксин 20
 Тироцидин 298, 307
 Титрования кривые 31, 32, 356
 Тозиламинокарбонильная группа 115
 Тозильная группа см. 4-Толуолсульфо-
 нильная группа
 4-Толлилметилсульфонильная группа 110
 2-(4-Толлилсульфонил)этоксикарбониль-
 ная группа 108
 2-(Толуол-4-сульфонил)этиловый эфир
 118
 4-Толуолсульфонильная группа 100, 103,
 111 и сл., 126, 129
 Тонкослойная хроматография 58 и сл.
 Тонкослойный электрофорез 58
 Трансаминирование см. Переаминирова-
 ние
 Транскрипция 393
 Транслокация 395
 Транспортная РНК 389 и сл.
 Транспортные белки 344, 412 и сл.
 Трансферазы 400
 Трансферрин 240
 Треонин 11, 15, 17, 89, 96, 104, 111, 132,
 133, 141, 187
 — биосинтез 51
 — масс-спектры 65
 — применение 38
 Третичная структура 363, 381 и сл.
 2,4,6-Триметилбензиловый эфир 118
 Триметилсилиловый эфир 119
 Триметилсилильная группа 132
 2,4,6-Тринитробензолсульфокислотой
 окрашивание 57
 Триостин А 301
 Трипсин 168, 211, 219, 244, 365
 Трипсина ингибитор 194, 214, 220
 Триптамин 72
 Триптофан 10, 11, 16, 17, 18, 19, 33, 104,
 111, 131
 — защита 130
 — применение 38
 — УФ-спектр 35
 Тритиевая метка 46
 Трифенилметильная (тригильная) группа
 103, 113, 120, 124, 129, 135, 205
 Трифторацетилглицин 12
 N-Трифторацетил-LL-депептида эфир 64
 Трифторацетильная группа 110, 112, 171
 2,2,2-Трихлор-*трет*-бутилоксикарбо-
 нильная группа 108
 2,4,5-Трихлорфениловые эфиры 149, 152
 Тромбин 340, 427
 Тропоколлаген 423
 Туберактиномицин 302
 Туберин 340
 Ультрафильтрация 347, 349
 Ультрафиолетовая дифференциальная
 спектроскопия 385
 Ультрацентрифуга 343, 360, 361, 388
 Уперолен 282, 283
 Уреаза 343, 357
 Урогастрон 275
 Урокиназа 428
 Фаллацидин 309, 310
 Фаллицин 309, 310
 Фаллоидин 309, 310
 Фаллоин 309, 310
 Фаллотоксины 309 и сл.
 Фенациловые эфиры 118
 Фенацильная группа 130

- 4-Фенилазобензилоксикарбонильная группа 104, 108
 (4-Фенилазофенил)изопропилоксикарбонильная группа 109
 Фенилазофениловый эфир 149
 Фенилаланин 16, 17, 46, 51
 Фениловые эфиры 119
 Фенилтиогидантоины 76, 369
 Ферментативные электроды 67
 Ферменты 344, 398 и сл.
 — аллостерические 399
 — иммобилизованные 54, 55, 169, 401
 — классификация 400, 401
 Фибронн шелка 14, 380, 421
 Физалемин 89, 94, 236, 282, 283
 Филлокинин 285
 Филломедузин 236, 282, 283
 Филлоперулеин 236, 284
 Фитогемагглютинины 428
 Фосфатидиламинокислоты 74, 75
 Фосфолипаза А2 219
 Фосфонийэтоксикарбонильная группа 115
 Фосфонептиды 298
 Фосфопротейны 345
 Фосфориазид 161
 Фосфориламинокислоты 74
 Фосфофруктокиназа 387
 Фрагментная конденсация 216, 217, 225
 Фракционирование по *Кону* 347, 348
 Франгулалин 319, 320
 Фталильная группа 104, 112
 Фталимидометиловый эфир 119
 ФТГ-аминокислоты 369
- Хеинопси 280
 Херцинин 70
 Химостатины 21
 Химотрипсин 168, 169, 211, 364, 365, 381, 408 и сл.
 Химотрипсиноген 357
 8-Хинолиловые эфиры 149, 173
 Хиноксалин 301
 Хиномицин 301
 Хиразил-Val 64
 Хламидоцин 90
 Хлорамфеникол 398
 Хлорацетамидометиловая группа 135
 N-Хлорацетиламинокислоты 54, 71
- Хлорацетиловая группа 100, 102, 110
 Хлорбензилоксикарбонильная группа 104
 Хлорметиловая группа 183, 186
 N-(5-Хлорсалицилал)-группа 114
 Хлоругольной кислоты алкиловые эфиры 141, 142
 5-Хлор-8-хинолиловые эфиры 149
 Холецистокининпанкреозимин 89, 94, 260, 274, 277, 284
Хопкинс-Коле реакция 355
 Хорнигонатропин человека
 Хорносоматомаммотропин человека 243
 Хроматография высокого давления 60
 Хромодиопсин 289
 Хромопротейны 345
- Цвиттеррионная структура 20, 30, 356
 Центрифужный реактор 192
 Центрифугирование, использование процесса 349, 360, 361
 Церулеин 89, 236, 284
 Церулоплазмин 420
 4-Цианбензилоксикарбонильная группа 104
 2-Циан-*трет*-бутилоксикарбонильная группа 108
 Цианметилловые эфиры 149
 Цибернины 253
 1-Циклогексил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидметиллиодид 155
 Циклодимеризация 203
 Циклопентилоксикарбонильная группа 109
 D-Циклосерин 22
 Циклотрипролил 84, 203
 Циркулины 308
 Циркулярный дихроизм 24—26, 385
 Цистеин 10, 15, 17, 38, 87, 221
 — биосинтез 50
 — защита 134 и сл.
 — применение 38
 Цистин 10, 27, 38, 214, 218, 219
 — мезоформа 27
 Цитохром с 190, 194, 357
 Цитруллин 23
- Частичный гидролиз 365
 Четырехкомпонентная конденсация 162—163, 173

- Шерсти волокно** 421
Штрекера синтез 42 и сл., 47
- Щеточная смола** 181
- Эдеин А** 301
Эдмана деградация 369
— секвенатор 343
Эйзенин 232
Эластаза 365
Эластин 421
Эледоизин 89, 94, 236, 282, 283
Электроды с оксидазой аминокислот 67
Электрофорез 34, 350, 351
— без носителя 351
— с додецилсульфатом натрия 362
Элонгации процесс 394
Эндорфины 231, 243, 248, 286, 289 и сл.
Энкефалины 168, 230, 243, 246, 289 и сл.
- Энниатин** 304
Энтеротоксин 387
Эргозин 318
Эритрокруорин 419
Эстеразы 400
1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидгидрохлорид 155
Этилкарбамоильная группа 135
N-Этил-N-метилглицин 12
Этиловые эфиры 104, 117, 118
N-Этил-5-фенилизоксазолний-3-сульфонат (*Вудворда* реагент К) 152
Этионин 21
N-Этоксикарбонилфталимид 112
1-Этоксикарбонил-2-этоксн-1,2-дигидрохинолин (ЭЭДХ) 143
- Ювенильных гормонов аналоги** 317
- Янга** тест 175

Содержание

	Предисловие редактора перевода	5
	Предисловие к третьему изданию	7
1.	Аминокислоты	9
1.1.	Номенклатура аминокислот	10
1.2.	Природные аминокислоты	13
1.2.1.	Протеиногенные аминокислоты	17
1.2.2.	Непротеиногенные аминокислоты	20
1.3.	Стереохимия аминокислот	23
1.3.1.	Оптическая активность аминокислот	23
1.3.2.	Конфигурация и конформация аминокислот	26
1.4.	Физико-химические свойства аминокислот	30
1.4.1.	Растворимость	30
1.4.2.	Кислотно-основные свойства	30
1.4.3.	Спектры поглощения аминокислот	35
1.5.	Получение аминокислот	38
1.5.1.	Выделение из белковых гидролизатов	38
1.5.2.	Микробиологические методы	39
1.5.3.	Ферментативные методы	41
1.5.4.	Методы химического синтеза	41
1.5.4.1.	Аминолиз галогенкарбоновых кислот	42
1.5.4.2.	Синтез Штрекера	42
1.5.4.3.	Азлактоновый синтез по Эрлеймейеру — Плехлю	43
1.5.4.4.	Гидантоновый синтез	44
1.5.4.5.	Алкилирование шиффовых оснований	44
1.5.4.6.	Синтезы с малоновым эфиром	45
1.5.4.7.	Синтез меченых аминокислот	45
1.5.4.8.	Асимметрические синтезы	47
1.5.4.9.	Пребиотические синтезы	48
1.5.4.10.	Биосинтез аминокислот	49
1.6.	Разделение рацематов аминокислот	51
1.6.1.	Методы кристаллизации	52
1.6.2.	Химические методы	53
1.6.3.	Ферментативные методы	53
1.7.	Анализ аминокислот	55
1.7.1.	Хроматографические методы	55
1.7.1.1.	Бумажная хроматография	57
1.7.1.2.	Тонкослойная хроматография	58
1.7.1.3.	Ионообменная хроматография	59
1.7.1.4.	Газовая хроматография	61
1.7.1.5.	Хроматографическое разделение энантиомеров	62
1.7.2.	Масс-спектрометрический анализ аминокислот	64

1.7.3.	Методы анализа с использованием изотопов	66
1.7.4.	Ферментативные методы	67
1.8.	Специфические реакции аминокислот	67
1.8.1.	Образование комплексов с металлами	67
1.8.2.	Реакции с азотистой кислотой	68
1.8.3.	Окислительное дезаминирование	69
1.8.4.	Переаминирование	69
1.8.5.	N-Алкилирование	70
1.8.6.	N-Ацилирование	71
1.8.7.	Декарбоксилирование	71
1.8.8.	Этерификация	73
1.9.	Циклические производные аминокислот	73
1.10.	Фосфорил- и фосфатидиламинокислоты	74
1.11.	Гликоаминокислоты	75
1.12.	Нуклеоаминокислоты	75
	Литература	76
2.	Пептиды	83
2.1.	Общие свойства пептидов	83
2.1.1.	Что такое пептиды? Их строение	83
2.1.2.	Классификация и номенклатура	84
2.1.3.	Нахождение пептидов в природе и их значение	89
2.2.	Пептидный синтез	92
2.2.1.	Основные положения	92
2.2.2.	Основной принцип пептидного синтеза	95
2.2.3.	История развития пептидного синтеза	98
2.2.4.	Защитные группы	100
2.2.4.1.	Защитные группы для аминной функции	101
2.2.4.1.1.	Защитные группы ацильного типа	102
2.2.4.2.	Защитные группы для карбоксильных и амидных функций	115
2.2.4.2.1.	Истинные карбоксизащитные группы	116
2.2.4.2.2.	Тактические карбоксизащитные группы	122
2.2.4.3.	ω -Защитные группы трифункциональных аминокислот	125
2.2.4.3.1.	Защита гуанидиновой функции аргинина	125
2.2.4.3.2.	Защита имидазольной функции гистидина	128
2.2.4.3.3.	Защита индольной функции триптофана	130
2.2.4.3.4.	Защита алифатической гидроксильной функции	131
2.2.4.3.5.	Защита ароматической гидроксильной функции	133
2.2.4.3.6.	Защита тиольной функции цистеина	134
2.2.4.3.7.	Защита тиоэфирной функции метионина	136
2.2.5.	Методы образования пептидной связи	137
2.2.5.1.	Азидный метод	138
2.2.5.2.	Ангидридный метод	141
2.2.5.2.1.	Метод смешанных ангидридов	141
2.2.5.2.2.	Метод симметричных ангидридов	143
2.2.5.2.3.	N-Карбоксангидриды (НКА)	144
2.2.5.3.	Метод активированных эфиров	146
2.2.5.4.	Карбодимидный метод	153
2.2.5.4.1.	Применение дициклогексилкарбодимида	154
2.2.5.4.2.	Применение модифицированных карбодимидов	154
2.2.5.4.3.	Применение карбодимидов с добавками	155
2.2.5.5.	Пептидные синтезы с применением соединений фосфора	158
2.2.5.5.1.	Метод Митина	159
2.2.5.5.2.	Метод Мукайма	159
2.2.5.5.3.	Применение других производных фосфора	160

2.2.5.6.	Методы конденсации, представляющие теоретический интерес ..	162
2.2.5.7.	Ферментативный синтез пептидов	166
2.2.6.	Проблемы рацемизации при пептидных синтезах	169
2.2.6.1.	Механизмы рацемизации	170
2.2.6.1.1.	Азлактонный механизм	170
2.2.6.1.2.	Рацемизация при прямом α -депротонировании	174
2.2.6.2.	Определение степени рацемизации	175
2.2.7.	Пептидные синтезы на полимерных носителях	178
2.2.7.1.	Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда)	179
2.2.7.2.	Жидкофазные методы	195
2.2.7.3.	Чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез	197
2.2.7.4.	Пептидный синтез с применением полимерных реагентов	199
2.2.8.	Синтез циклических пептидов	201
2.2.8.1.	Синтез гомодетных циклических пептидов	201
2.2.8.2.	Синтез гетеродетных циклических пептидов	204
2.2.9.	Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов	208
2.2.9.1.	Синтезы гомо- и гетерополиаминокислот	209
2.2.9.2.	Синтез регулярных полипептидов	210
2.2.10.	Стратегия и тактика пептидного синтеза	211
2.2.10.1.	Стратегия пептидного синтеза	211
2.2.10.1.1.	Ступенчатое наращивание пептидной цепи.	212
2.2.10.1.2.	Стратегия фрагментной конденсации	216
2.2.10.1.3.	Семисинтез	218
2.2.10.2.	Тактика пептидного синтеза	220
2.2.10.2.1.	Выбор комбинации защитных групп	220
2.2.10.2.2.	Метод конденсации	225
2.2.10.3.	Возможности и ограничения пептидного синтеза	226
2.3.	Биологически активные пептиды	230
2.3.1.	Пептидные и белковые гормоны	232
2.3.1.1.	Кортикотропин	240
2.3.1.2.	Соматотропный гормон	243
2.3.1.3.	Пролактин	245
2.3.1.4.	Липотропин	245
2.2.1.5.	Меланоцитстимулирующий гормон	246
2.3.1.6.	Окситоцин и вазопрессин	247
2.3.1.7.	Гормоны гипоталамуса	252
2.3.1.7.1.	Тиреолиберин	255
2.3.1.7.2.	Гонадолиберин (рилизинг-фактор гонадотропина)	257
2.3.1.7.3.	Кортиколиберин	257
2.3.1.7.4.	Пролактолиберин и пролактостатин (рилизинг-фактор пролактина и гормон, ингибирующий выделение пролактина)	258
2.3.1.7.5.	Меланолиберин и меланостатин (рилизинг-фактор меланотропина и гормон, ингибирующий выделение меланотропина)	258
2.3.1.7.6.	Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина)	259
2.3.1.7.7.	Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина)	259
2.3.1.8.	Инсулин	262
2.3.1.9.	Глюкагон	270
2.3.1.10.	Паратиреоидный гормон	271
2.3.1.11.	Кальцитонин	273
2.3.1.12.	Гормоны желудочно-кишечного тракта	274
2.3.1.12.1.	Гастрин	275
2.3.1.12.2.	Секретин	277
2.3.1.12.3.	Холестикокининнпакреозимин	277
2.3.1.12.4.	Мотилин	278
2.3.1.13.	Ангиотензин	278
2.3.1.14.	Вещество P	279

2.3.1.15.	Нейротезин	280
2.3.1.16.	Кинины плазмы крови	281
2.3.2.	Пептиды животного происхождения с гормоноподобными активностями	281
2.3.2.1.	Тахикнины	282
2.3.2.2.	Группа бомбезина	283
2.3.2.3.	Группа церулена	284
2.3.2.4.	Брадикинины амфибий	284
2.3.3.	Нейропептиды	285
2.3.3.1.	Пептиды, осуществляющие «перенос памяти»	288
2.3.3.2.	Эндорфины	289
2.3.4.	Пептиды с иммунологическим действием	295
2.3.5.	Пептидные антибиотики	296
2.3.5.1.	Пептидные антибиотики, подавляющие биосинтез клеточных стенок бактерий	298
2.3.5.2.	Пептидные антибиотики, подавляющие синтез и функционирование нуклеиновых кислот	299
2.3.5.3.	Мембраноактивные антибиотики	302
2.3.6.	Пептидные токсины	309
2.3.7.	Пептидные инсектициды	316
2.3.8.	Пептидные алкалоиды	318
	Литература	320
3.	Белки	340
3.1.	Значение. Исторический аспект	340
3.2.	Классификация белков	344
3.3.	Выделение и очистка	345
3.4.	Обнаружение и количественное определение	355
3.5.	Физико-химические свойства	356
3.5.1.	Цвиттер-ионная природа белковой молекулы	356
3.5.2.	Растворимость	357
3.5.3.	Денатурация	358
3.5.4.	Молекулярная масса	359
3.5.5.	Форма молекул	362
3.6.	Принципы структурной организации белковых молекул	363
3.6.1.	Первичная структура	364
3.6.1.1.	Селективное расщепление полипептидных цепей	365
3.6.1.2.	Установление аминокислотной последовательности	367
3.6.1.2.1.	Определение конечных аминокислот	367
3.6.1.2.2.	Ступенчатая деградация полипептидной цепи	369
3.6.2.	Вторичная и третичная структуры	374
3.6.2.1.	Пространственное расположение полипептидной цепи	375
3.6.2.1.1.	Спиральные структуры	378
3.6.2.1.2.	Структура складчатого листа	379
3.6.2.1.3.	Неупорядоченные конформации полипептидной цепи	381
3.6.2.1.4.	Третичная структура глобулярных белков	381
3.6.2.2.	Методы установления пространственной структуры белков	383
3.6.3.	Четвертичная структура	386
3.7.	Биосинтез белков	388
3.7.1.	Активация аминокислот и их связывание с тРНК	388
3.7.2.	Образование полипептидной цепи на рибосоме	391
3.7.3.	Отделение полипептидной цепи от рибосомы	395
3.7.4.	Регуляция биосинтеза белка	397

Избранные примеры функциональных белков	398
Ферменты	398
Рибонуклеаза	401
Лизоцим	404
Химотрипсин	408
Карбоксипептидаза А	410
Транспортные и резервные белки	412
Миоглобин	412
Гемоглобин	415
Металлопротеины	419
Структурные белки	420
Кератины	421
Коллагены	422
Белки с защитными функциями	424
Имуноглобулины	424
Фибриноген — фибрин	427
Лектины	428
Белки, препятствующие замерзанию	429
Интерфероны	430
Литература	432
Предметный указатель	438

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Ханс-Дитер Якубе, Ханс Ешкайт

Аминокислоты, пептиды, белки

Научный редактор Т. И. Почкаева

Мл. научный редактор И. А. Колчин

Художник И. И. Каледян

Художественный редактор М. Н. Кузьмина

Технические редакторы: Н. Б. Панфилова и Л. С. Тимофеева

Корректор Н. В. Башкирева

ИБ № 3937

Подписано к печати 28.03.85. Формат 60×90^{1/16}. Бумага офсетная № 2.

Гарнитура таймс. Печать офсетная.

Объем 14,25 бум. л. Усл. печ. л. 28,50. Усл. кр.-отт. 28,50.

Уч.-изд. л. 33,73. Изд. № 3/2904. Тираж 2700 экз.

Зак 334. Цена 5 р. 40 к.

Набрано в издательстве «Мир»

на фотонаборном комплексе «Компьюграфик»

129820, ГСП Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Тульская типография Союзполиграфпрома

при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли.

300600, Тула, проспект им. В. И. Ленина, 109.